A 03.00.04
B-126

ՀՀ ԳԱԱ Հ.Ք. ԲՈՒՆԻԱԹՅԱՆԻ անվ. ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՀԱՍՄԻԿ ԳՈՒՐԳԵՆԻ ՎԱՀՐԱԴՅԱՆ

ՆԵՅՐՈՀՈՐՄՈՆԱՅԻՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ՆՈՐ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ ՆԵՅՐՈԴԵԳԵՆԵՐԱՑԻԱՅԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Գ.00.04 – «Կենսաքիմիա» մասնագիտությամբ

կենսաբանական գիտությունների դոկտորի գիտական աստիճանի

հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2004

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. Г.Х. БУНЯТЯНА НАН РА

ВАГРАДЯН АСМИК ГУРГЕНОВНА

НОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ В УСЛОВИЯХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертация на соискание ученой степени

доктора биологических наук

по специальности:

03.00.04 - «Биохимия»

ЕРЕВАН – 2004

© National Library of Armenia OCR by Portmind

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Հ.Բ. Բունիաթյանի անվ. Կենսաքիմիայի Ինստիտուտի Գիտական Խորհրդի նիստում:

Գիտական խորհրդատուներ՝ ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆ. Ա.Ա. Գալոյան
ՀՀ ԲԳԱ ակադեմիկոս, կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆ. Մ.Ի. Աղաջանով

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆ. Մ.Ա. Դավթյան
ՀՀ ԲԳԱ ակադեմիկոս, բժշկական գիտությունների դոկտոր, պրոֆ. Լ.Ն. Մկրտչյան
կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր Ս.Ա. Բաջինյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Հայկական գյուղատնտեսական ակադեմիա

Ատենախոսության պաշտպանությունը կկայանա 9 ապրիլի 2004 թ. ժ. 12^{00} բական խորհրդի նիստում (ՀՀ, 375014, ք. Երևան, Պ. Սևակի փ. 5/1)

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Կենսաքիմիայի Ինստիտուտի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքվել է 9 մարտի 2004 թ.

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար՝
կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր Ս.Ա. Սիմոնյան

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института Биохимии им. Г.Х. Бунятяна НАН РА.

Научные консультанты: Академик НАН РА, доктор биологических наук, профессор А.А. Галоян
Академик АМН РА, доктор биологических наук, профессор М.И. Агаджанов

Официальные оппоненты: Академик НАН РА, доктор биологических наук, профессор М.А. Давтян
Академик АМН, доктор медицинских наук, профессор Л.Н. Мкртчян
Доктор биологических наук, профессор С.А. Баджинян

Ведущая организация: Армянская сельскохозяйственная академия

Защита состоится 9 апреля в 12^{00} ч. на заседании специализированного совета 042 при Институте Биохимии НАН РА (Республика Армения, 375014, г. Ереван, ул. П.Севака 5/1)

С диссертацией можно ознакомится в библиотеке Института Биохимии НАН РА.

Автореферат разослан 9 марта 2004 г.

Ученый секретарь специализированного совета, доктор биологических наук, профессор А.А. Симонян

Հայաստանի Ազգային Գրադարան
764-2004

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одним из фундаментальных достижений современной нейрохимии и нейроиммунологии является открытие нового семейства нейрогормонов-цитокинов гипоталамуса, которые синтезируются в нейросекреторных клетках N. Supraopticus and N.Paraventricularis (NSO, NPV) и транспортируются пептидергическими волокнами гипоталамо-гипофизарного тракта в нейрогипофиз [Galoyan A. et al., 1992; Galoyan A, 1995; Galoyan A., 1997; Galoyan A. et al., 1999; Galoyan A. 2003]. Расшифрована первичная структура нейрогормонов – пролином богатых полипептидов (prolin-rich polypeptides) – ПБП.. транспортирующихся аксонально (и гуморально) вплоть до спинного мозга (СМ). Исследования показали, что ПБП является продуктом протеолиза нейрофизин-вазопрессин-ассоциированного С-концевого гликопротеина и, наряду с вазопрессином и окситоцином, переносится из гипоталамуса к нейрогипофизу аксональным транспортом.

Открытие нейросекреции клеток гипоталамических магноцеллюлярных ядер (NPV и NSO), образование в них вазопрессина и окситоцина[Du Vigneaud V. et al., 1954], стало началом становления современной молекулярной нейроэндокринологии. Вслед за этими открытиями последовали открытие рилизинг гормонов гипоталамуса, выделение и изучение этих пептидов [Guillemin R. 1977; Schally A.V. et al., 1978]. Были выявлены рилизинг гормоны LH-RH, GH-RH, соматостатин и др. Открыта роль аналогов рилизинг гормонов (LH-RH и др.) в лечении рака различных органов (Schally A.V. et al., 2001).

Как написал академик Т.Т. Березов (см. Biochemical Education, т.26, с.330, 1998, США), "Наряду с этими исследованиями проф. А.Галоян выдвинул свою собственную теорию, которая основывается на результатах его 35-летних исследований". Результаты этих исследований привели к формированию двух новых направлений в нейробиологии: нейроэндокринной кардиологии и нейроэндокринной и:ммунологии.

Дальнейшее развитие указанных направлений имеет важное значение для понимания функций мозга и организации нейрогормональных функций в целом. На этом основывается создание новых эндогенных нейрогормональных препаратов для лечения нервных, эндокринных, иммунных и других заболеваний.

Детальное изучение сигнальных молекул нейроэндокринной иммунной системы мозга выявило синтезируемые в гипоталамусе пептиды, многие из которых продуцируются в нейросекреторных клетках гипоталамуса. Была установлена их первичная структура (Galoyan A., 1997). В частности, в нейросекреторных клетках гипоталамуса обнаружен иммунофилин (состоящий из 107 аминокислот), участвующий в механизмах биосинтеза интерлейкинов (в особенности IL-2). Одновременно установлен процесс биосинтеза интерлейкинов IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-6, TNF и др. в нейросекреторных клетках гипоталамуса и их выход в нейрогипофиз (Galoyan A, 1997).

За последнее десятилетие Галояном А.А. и сотр. открыто новое семейство ПБП, включающее 4 пептида, каждый из которых проявляет специфичные свойства в отношении различных функций организма. Наиболее изученным из них является ПБП-1 (в нашей работе обозначен как ПБП), обладающий широким спектром

© National Library of Armenia

биологической активности (Galoyan A, 2001). Широкий спектр биологических свойств ПБП рассматриваются в аспекте их метаболической активности, антибактериального и антивирусного действия, миелогенезиса, лимфопоэза, иммуномодуляторного действия, нейропротективных (Галоян А.А. 1999; Агаджанов М.И. и др., 2000) и нейрогормональных свойств. Многочисленные данные указывают на полифункциональность ПБП и вовлеченность указанного нейропептида во многие биологически значимые процессы в норме и при патологии (Galoyan A.A. et al., 2000, Aghajanov M.I. et al., 2002). Так, установлено, что ПБП участвует в механизмах экспрессии интерлейкинов (TNF, IL-1, IL-6) в фибробластах, макрофагах и астроцитах. Исследования А. Галояна и сотр. по опосредуемой ПБП ингибиции проапоптотических каспаз -3 и -9, а также активации каспаз -2 и -6 (Galoyan A. et al, 2000), явились началом изучения универсальных протекторных свойств ПБП при нейродегенеративных процессах.

Являясь иммуномодулятором и стимулятором иммунокомпетентных клеток (Galoyan A, 1997), ПБП активирует образование IL-1, IL-6 и TNF-α в астроцитах (Galoyan A. et al, 1998), проявляет нейропротекторное действие при интоксикациях змеиными ядами [Саркисян Дж.С. 2000], гемисекцией спинного мозга [Саркисян Дж.С. и др. 2002, Галоян А. и др. 2002], проявляет антибактериальное влияние in vivo и антивирусное действие in vitro [Галоян А., Камалян Р., 2000; Galoyan A. et al., 1998; Априкян В., Галоян А., 1999; Aprikian V. et al., 1999; Aprikian V., Galoyan A., 2000], наконец, является NGF-подобным соединением, стимулирующим секрецию таковых из нейроглиальных элементов (Chechorm et al., 2001).

Проблема моделирования нейродегенеративных поражений ЦНС, к числу которых относится и болезнь Альцгеймера (БА), тесно сопряжена с исключительно актуальной проблемой изучения патогенеза и лечения этого тяжелейшего недуга человечества. Большинство имеющихся данных о БА базируется на результатах посмертных исследований, в результате чего они несут инфомацию лишь о завершающих, порой терминальных стадиях заболевания, что выдвигает проблему разработки корректных экспериментальных моделей БА, максимально приближенных к применяемой патологии в число одной из актуальных проблем нейронауки.Воспроизведение адекватной модели предпологает раскрытие новых приоритетных направлений в изучении клеточно-молекулярных основ ее патогенеза и целенаправленной разработки путей профилактики и терапии.

Цель и задачи исследования. *Целью* исследования явилось изучение протекторного и корригирующего действия синтетического аналога гипоталамического нейрогормона - пролин-богатого полипептида (*ПБП*) на механизмы развития нейрохимических, нейрогормональных, иммуномодуляторных и морфо-функциональных нарушений, развивающихся при алюминиевом нейротоксикозе и нейродегенеративных изменениях, индуцированных *β*-амилоидным пептидом (модели БА).

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

- исследовать в условиях алюминиевого нейротоксикоза иммуномодулирующее действие различных концентраций *ПБП* – его способность воздействовать на продукцию иммуноцитокинов (*ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6*) и инсулиноподобного фактора роста (*ИФР-1*), в различных образованиях головного мозга (целостный мозг, гиппокамп и кора головного мозга), тимусе, печени и сыворотке крови экспериментальных животных;
- на модели алюминиевого нейротоксикоза изучить роль нейроэндокринных механизмов и, в частности, гипофизарного пролактина в реализации иммуномодулирующего действия оптимальных и низких доз *ПБП* на синтез различных представителей иммуноцитокинов в целостном мозге, гиппокампе, тимусе, печени и сыворотке крови;
- интегрально охарактеризовать способность *ПБП* предупреждать и корригировать различные проявления *оксидативного стресса*, развивающиеся при остром и хроническом алюминиевом токсикозе в виде расстройств со стороны системы про- и антиоксидантных металлопротеинов крови, включая уровень цитохромов: b_5, Σb_{588} I-IV сыворотки, Σb_{588} мембран эритроцитов, содержание и O_2^--продуцирующую способность супрола, активность *Cu,Zn-СОД*, каталазы, церулоплазмина и трансферрина;
- исследовать влияние *ПБП* на сдвиги тканевого уровня металлопротеинов - ферментов антирадикальной защиты клетки, *Cu,Zn-СОД*, каталазы, цитохрома *c* и содержания *МДА* в целостном мозге и гиппокампе, развивающиеся при остром и хроническом алюминиевом нейротоксикозе;
- изучить способность *ПБП* предупреждать ультраструктурные нейродегенеративные поражения различных структур головного мозга, развивающиеся в нейронах гиппокампиального комплекса, моторной и лимбических зон коры и клеток магноцеллюлярных ядер гипоталамуса (*супраоптического и паравентрикулярного)* при алюминиевом нейротоксикозе и интрацеребровентрикулярном введении агрегированной формы *β*-амилоидного пептида (*25-35*);
- изучить превентивное и корригирующее действие ПБП на пре- и постстимульную характеристики импульсного потока пирамидного нейрона в *CA2* гиппокампа в условиях одиночного и частотного раздражения энторинальной коры мозга того же полушария в норме и на модели нейродегенеративного поражения, индуцированного введением в латеральные желудочки мозга *β*-амилоидного пептида.

Научная новизна. На основании результатов исследований, выполненных на модели алюминиевого нейротоксикоза, выявивших отчетливое и разнонаправленное влияние различных концентраций *ПБП* на продукцию иммуноцитокинов (*ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6*) и инсулиноподобного фактора роста (*ИФР-1*), вырабатываемых *in situ* в целостном мозге, гиппокампе и коре больших полушарий и, прямо или косвенно, участвующих в процессах образования атипичных нейрональных амилоидных белков при нейродегенеративных заболеваниях мозга, сформулировано положение о центральном иммуномодулирующем действии *ПБП*.

Впервые установлена способность различных доз *ПБП* оказывать при алюминиевом токсикозе разнонапрвленное действие на выработку *ИЛ-1, ИЛ-2* и

© National Library of Armenia

ИЛ-6 в тимусе и печени, что позволило выдвинуть представление о непосредственном модулирующем влиянии *ПБП* на клетки моноцитарно-фагоцитарного ряда и, в первую очередь, купферовские клетки печени.

Приоритетными являются данные, акцентирующие внимание на иммуномодулирующих эффектах исключительно низких концентраций ПБП, оказывающих при алюминиевом нейротоксикозе нормализующее действие на иммуноцитокиновый баланс и уровень ИФР-1 в сыворотке крови и тканях исследуемых органов, что является существенным подтверждением проявлений иммуномодулирующих свойств исследуемого нейропептида.

Выявлена существенная роль нейроэндокринного звена и, в частности, гипофизарного пролактина в реализации выявленного на модели алюминиевого нейротоксикоза направленного коррегирующего иммуномодулятрного эффекта оптимальных и низких концентраций ПБП на продукцию иммуноцитокинов и ИФР-1 в целостном мозге, гиппокампе, тимусе, печени и крови.

Убедительно продемонстрировано наличие у *ПБП* нового, ранее неизвестного свойства – способности оказывать при алюминиевом токсикозе антиоксидантное действия и угнетать интенсивность процессов липидной пероксидации путем влияния на уровень металлопротеинов про- и антиоксидантного действия: цитохромов сыворотки крови и мембран эритроцитов, супрола, активность ферментов антирадикальной защиты - *Cu, Zn-СОД*, каталазы, церулоплазмина и трансферрина.

Выявлены и детально охарактеризованы ультрастуктурные корреляты нейропротекторного действия *ПБП* на моделях нейродегенеративных поражений мозга; способность нейропептида предотвращать накопление в цитоплазме нейронов гиппокампа частиц алюминия, их проникновение через ядерную мембрану, как и предупреждать нейродегенеративные изменения в нейронах гиппокампального комплекса, неокортекса, магноцеллюлярных ядер гипоталамуса, развивающихся при интрацеребровентрикулярном введении β-амилоидного пептида.

Впервые на интактных животных и на модели амилоидной нейродегенарации мозга нейрофизиологическими исследованиями выявлены особенности действия *ПБП* на изменения спайковой активности нейронов гиппокампа при одиночном и частотном раздражении энторинальной коры мозга, что позволило получить убедительные аргументы функционального характера, подтверждающие развиваемое положение относительно наличия у *ПБП* выраженного нейропротекторного действия при нейродегенеративных поражениях мозга.

Научно-практическая значимость. Результаты, полученные в ходе работы, имеют как практическую, так и теоретическую ценность.

Большинство сведений о БА исходит из исследования посмертных тканей, и поэтому, основное количество сведений имеется о патологии конечных стадий этого заболевания, и очень мало о его начальных стадиях. Поэтому одним из принципиальных положений исследования БА является создание модели на животных, как можно полнее воспроизводящей симптомы заболевания. Проведенные исследования позволили изучить патогенез нейродегенерации, а также манипулировать с этиологическими факторами и в дальнейшем испытывать

нейропротекторное и иммуномодуляторное свойство гипоталамического полипептида- ПБП в качестве возможного средства профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний.

Апробация материалов диссертации. Материалы диссертационной работы были доложены на Третьей Конференции Армянской Ассоциации Международной Организации по исследованию мозга (IBRO) (Ереван, 2000), Международной конференции "Biochemical and molecular-biological aspects of the brain immune system" (Ереван-Цахкадзор, 2001), Шестом съезде Армянского физиологического общества (Ереван, 2001), Международной конференции "Free radicals and antioxidants in the development and functions of the central nervous system: From fetus to ageing" (Санкт-Петербург, Россия 2001), ESN Conference on: "Advances in molecular mechanisms of neurological disorders" (Perugia, Italy, 2001), Gordon Research Conference «Metals in Biology» (West Kingston, USA, 2001), Международной конференции "IBC's 9th Annual Conference on Alzheimer's (Atlanta, USA, 2001), Всеармейской военно-врачебной научно-практической первой конференции (Ереван, 2001), Пятой научной сессии "Биологически активные вещества в медицине" (Ереван, 2001), Шестой Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, Россия, 2002), "18th International conference of Alzheimer's disease international» (Barcelona, Spain 2002), 34rd Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry, (Newport Beach, California, USA 2003), International Conference «Frontiers in Neurodegenerative Disorders and Aging: Fundamental Aspects, Clinical Perspectives and New Insights» (Antalya, 2003), International Conference «The Role of the Biologically Active Substances in the Integrative Activity of the Organism in Normal Conditions and in the Process of Adaptive Syndrome Formation» (Yerevan State Med. University, 2003).

Публикация работ. По теме диссертации опубликовано 30 печатных работ в отечественных и иностранных журналах, материалах конференций, симпозиумов и съездов.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 231 страницах машинописного текста, включая 44 рисунков и 13 таблиц. Она состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, 4 глав результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 365 источников.

© National Library of Armenia

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Использованные экспериментальные модели. В соответствии с поставленными на различных этапах задачами исследования проводили в различных вариантах экспериментального моделирования БА. Исследования проводились на белых мышах – самцах массой 30-40 г и половозрелых беспородных белых крысах массой 180 – 200 г.

- **острый алюминиевый нейротоксикоз** вызывали путем подкожного введения животным (белые крысы) 0,2 мл 10% раствора хлорида алюминия. Контрольные животные получали аналогичным образом 0,9% раствор NaCl. Животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Кровь и внутренние органы (мозг, гиппокамп и печень) забирали в различные сосуды на холоду и обрабатывали одновременно. При двукратном введении хлорида алюминия был выявлен относительно низкий падеж животных, что послужило основанием для использоания указанной дозы при моделировании БА у крыс. Экспериментальную модель БА у *мышей* создавали путем однократного подкожного введения 0,2 мл 3% хлорида алюминия. Животных подразделяли на следующие три группы: контрольная группа интактных животных, I опытная группа – с однократным введением $AlCl_3$, II опытная группа – на 4-е сутки после введения $AlCl_3$ внутрибрюшинно (в/б) вводили ПБП в дозе 15 и 1,5 мкг/40 г массы животного. Забой животных производили на 8-е или 12-е сутки (для мышей и крыс соответственно) после введения $AlCl_3$.
- **Хронический алюминиевый нейротоксикоз** у белых половозрелых крыс вызывали путем перорального введения животным (с питьевой водой) 10% раствора хлорида алюминия в течении одного и трех месяцев
- **Модель амилоидного повреждения мозга.** С целью индуцирования амилоидного повреждения мозга и изучения нейротоксических свойств фрагмента бета-амилоидного пептида – βА (25-35) в процессах нейродегенерации, исследования проводились в 5 сериях на крысах - самцах массой 250-300 г под нембуталовым наркозом: 1. интактные животные; 2. Инъецированные стерильной дистилированной водой интрацеребровентрикулярно(icv) в латеральные желудочки мозга с обеих сторон по координатам стереотаксического атласа (Paxinos G., Watson C., 1986) АР-1 мм, L±1,5 мм, DV+3,5 мм со скоростью 1 мкл/мин и выдержанные до эксперимента в течение 45 дней; 3. Инъецированные icv 30 нмоль βА(25-35), агтрегированным согласно Maurke et al.(1 мг/мл в стерильной дистилированной воде при t=37^{0}C в течение 4-х дней) в латеральные желудочки мозга с обеих сторон со скоростью 1 мкл/мин и выдержанные до эксперимента в течение 45 дней; 4. Инъецированные icv агтрегированным βА(25-35) в сочетании с однократной в/б инъекцией 15 мкг ПБП за 24 часа до введения βА; 5. Инъецированные icv агтрегированным βА(25-35) в сочетании с однократной в/б инъекцией 15 мкг ПБП на 6-е сутки после введения βА.

Нейроморфологические исследования. Мозг крыс извлекали и фиксировали 1-3 дня в 10% формалине при 4^0 С, а затем промывали в течении ночи в физиологическом растворе, содержащем 15% сахарозы для сохранения структур.

Мозг заключали в парапласт и делали фронтальные срезы толщиной 10 мкм. Фронтальные криостатные срезы (10 мкм) и свободноплавающие микротомные срезы (50 мкм) из различных отделов мозга промывали в 10% и 5% растворах сахарозы, а затем в физиологическом растворе и с целью выявления нервных структур, окрашивали толуидиновым синим по Рохману: Окрашивались в течение 15 минут в 0,1% растворе толуидинового синего, приготовленного на ацетатном буфере pH 4,8; промывались в большом количестве буфера; инкубировались в течение 10 минут в 1% растворе желтой кровяной соли, приготовленной на дист. воде; обезвоживались в трех порциях 70^0 спирта и в двух порциях ксилола, а затем заключались в канадском бальзаме; в срезах, окрашенных толуидиновым синим была проведена оценка нейродегенерации.

Синтез и идентификация нового гипоталамического пролином- богатого полипептида состоящего из 15-аминокислотных остатков, а также *β-амилоидного полипептида (25-35)* по предложению проф. А.Галояна были синтезированы проф. М.Титовым и М. Жмаком с использованием F-moc аминокислотных остатков.
Молекулярный вес и степень очистки пептида были определены с помощью HPLC и масс – спектрального анализа (MALDI). Препарат растворен в физиологическом растворе NaCl, стерилизован фильтрацией (размер пор 0,22 мкм) с последующим спектрофотометрическим определением его содержания в 1 мл раствора. Ранее А.Галоян показал биологическую устойчивость ПБП в физиологическом растворе в течение 1-2 года.

Определение содержания про- и антиоксидантных металлопротеинов. Для изучения нейропротекторного влияния ПБП на содержание металлопротеинов про- и антиоксидантного действия были использованы белые половозрелые крысы. Животные были подразделены на четыре группы: Контрольная группа (в/б введение 0,2 мл физ. р-ра на 1-й и 3-й дни опыта); I-ая опытная (п/к введение 0,2 мл 10% р-ра $AlCl_3$ на 1-й и 3-й дни опыта); II-ая опытная (в/б введение 20 мкг ПБП на шестой день после инъекции $AlCl_3$); III-ая опытная (в/б введение 20 мкг ПБП за час до инъекции хлорида алюминия). В следующих сериях эксперимента был изучен дозо-зависимый эффект ПБП на содержание указанных металлопротеинов. Забой животных проводили на 12-й день эксперимента

Металлопротеины крови прооксидантного действия (цитохром B_5 из гемолизата, B_{558}I и B_{558}II из сыворотки крови, B_{558}III и B_{558}IV из мембран эритроцитов и супрол из сыворотки крови) и антиоксидантного действия (Cu, Zn-COD и каталаза из гемолизата, церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) из сыворотки крови) одновременно получали по методу описанным Симоняном М.А. (1997).

После разделения сыворотки и эритроцитов и отмывания последних от форменных элементов и плазмы физиологическим раствором, очищенные эритроциты гемолизировали в воде. Мембраны эритроцитов выделяли центрифугированием при pH-5,6 и мембранные белки солюбилизировали 0,5% неионным детергентом (тритон х-100 и нонидет р-40, Германия). После диализа гемолизата, сыворотки и фракции мембранных белков диализировали против воды и после центрифугирования супернатанты подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозах КМ-52 и ДЕ-52 (Whatman, Англия) и на сефадексе ДЕАЕ А-50 (Pharmacia, Швеция). Обогащенные белковые фракции очищали на

© National Library of Armenia

биогелях Р-100 и Р-150 (Reanal, Венгрия). В процедуре получения и очистки металлопротеинов были использованы центрифуги К – 24, К-70, спектрофотометр "Specord M-40" (Германия) и стеклянные колонки с фильтрами (2х20 см и 2х80 см).

СОД-активность и супероксидпродуцирующую активность супрола определяли в сыворотке крови и тканях крыс нитротетразолиевым методом (Nishikimi M., et al, 1972) путем определения процента ингибирования или прироста (в случае супрола) образования формазана в расчете на 1мл сыворотки крови или 1г ткани соответственно.

Каталазную активность фракций полученных из гомогенатов тканей мозга, гиппокампа, печени и эритроцитарных мембран определяли спектральным методом (Abei H., 1974) или перманганатометрией, рассчитав количество расщепляющейся перекиси водорода в присутствии определенных количеств фракций за 1 мин при 20^0 С. Удельные активности были определены в расчете на 1 мл сыворотки (для супрола) и 1 мл эритроцитов (для СОД и каталазы).

Ферроксидазную активность церулоплазмина в сыворотке крови крыс определяли спектральным методом [Megahan M.C., 1989]. В качестве количественного показателя металлопротеинов крови использовали величины плотностей характерных максимальных оптических поглощений. *Количество трансферрина* определяли по величине плотности максимального оптического поглощения при 470 нм.

Выделение металлопротеинов антиоксидантного действия (Cu, Zn-COD и каталазу) из мозга проводили методом [Симонян М.А., 1988] с некоторой модификацией. Ткани мозга, гиппокампа и печени в определенных соотношениях гомогенизировали в 0,04 М калий фосфатном буфере при pH 7,4. Часть гомогенатов оставляли для определения малонового диальдегида (МДА) методом Владимирова Ю.А. и Арчакова А.И.(1972).

Далее гомогенаты гомогенизировали в ацетоне. Ацетоновые порошки смешивали с 0,04 М калий фосфатным буфером, инкубировали в течении часа. Нерастворимый остаток удаляли центрифугированием и супернатант диализировали против воды. Отдиализованные супернатанты этих смесей подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозе ДЕ – 52. СОД и каталазу из колонок элюировали 0,03 М и 0,1 М калий фосфатным буфером соответственно.

Нейроиммунологические исследования. Для изучения иммуномодулирующего влияния ПБП на содержание цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6), пролактина и инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1), сыворотку крови и супернатанты, приготовленные из внутренних органов мышей (цельная мозговая ткань, гиппокамп, тимус и печень), подвергали *иммуноферментному анализу (ELISA)*. Для этой цели животных декапитировали и извлекали цельный мозг, печень и тимус, которые после освобождения мозга от оболочек и сосудов и отмывки от крови охлажденным изотоническим раствором NaCl, их на льду выделяли раздельно. Кору больших полушарий и гиппокамп с замораживанием в жидком азоте сохраняли до проведения исследования. В последующем ткани взвешивали и гомогенизировали в среде выделения - 0,9% раствор NaCl (1:10) в гомогенизаторе "Potter S", со скоростью 1500 об/мин в течении 1 минуты. Гомогенаты центрифугировали при 3000 об/мин в течении 10 мин при 4^0 С и

отбирали супернатанты.

Цитокины определяли при помощи КИТ-наборов DRG International Inc (USA), выражая в пкг/мл. Содержание пролактина определяли с использованием КИТ-набора Microwell™ FSH EIA (USA). Количество пролактина выражали в нг/мл.

Радиоизотопный метод определения инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1) в коре головного мозга и сыворотке крови мышей определяли на радиоизотопном счетчике "Гамма" (Россия-Украина), при помощи кит-набора JGF-1 J^{125} фирмы Amersham Biotech (USA).Радиоизотопная активность выражалась в импульсах/мин. Определяемые показатели были обратно пропорциональны концентрации ИФР-1, т. е высокая активность соответствовала низким концентрациям гормона и наоборот.

Электронно-микроскопические исследования при алюминиевом нейротоксикозе проводились проф.Шахламовым В.А. и проф.Галояном А.А в Институте Морфологии Человека РАМН. Исследования проводились на 30 беспородных крысах-самцах. массой 120 г по следующим сериям:I серия – 3 крысы (контроль[1] 1) ничего не вводилось; II серия – 2 крысы (контроль[1] 2), животным вводили ежедневно в течение 3-х дней подкожно 10% раствор $AlCl_3$ по 0,2 мл; III серия – 5 крысам предварительно вводили 0,5 мл раствора ПБП, содержащего 0,1 мг ПБП, на следующий день этим же животным вводили 0,2 мл 10% $AlCl_3$, на 3-й день вновь вводили 0,2 мл 10% $AlCl_3$, и на 4-й день вновь 0,2 мл 10% $AlCl_3$.

Забой животных проводили под эфирным наркозом, кусочки тканей из гиппокампа фиксировали 2,5% раствором на холоду глютаральдегидом на кокадилатном буфере (pH =7,3). После двукратной промывки в течение 24 часов кусочки тканей фиксировали 1% раствором четырехокиси осмия на кокадилатном растворе (pH =7,3) в течение 2-х часов и вновь промывали буфером, а затем проводили по спиртам возрастающей крепости. Заливка кусочков тканей проводилась в эпон-аралдите. Ультратонкие срезы изучали в электронном микроскопе JEH -100CX при ускоряющем напряжении 80 kV.

© National Library of Armenia

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1.Корригирующее действие ПБП на содержание интерлейкинов, пролактина и инсулиноподобного фактора роста-1 в тканях крыс при остром алюминиевом нейротоксикозе.

За последние годы установлено, что в качестве провоцирующих факторов, обеспечивающих синтез предшественников амилоидного белка в нейрональных структурах головного мозга, выступают ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО [Shigematsu K. et al., 1992; Wen TC., Tanakaj et al., 1998; Zalcman S. et al., 1998, Muller T. et al., 1998]. Одновременно выявлено, что синтез иммуноцитокинов в нейрональных структурах в условиях физиологической деятельности организма весьма четко сбалансирован за счет выработки аденогипофизом ростковых гормонов, пролактина и инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1).

Как показали результаты проведенного иммуноферментного анализа, после введения $AlCl_3$ в сыворотке крови мышей определяются следовые количества ИЛ-1, (рис.2) в то время как у животных контрольной группы ИЛ-1 выявить не удалось. После однократного введения ПБП уровень ИЛ-1 в крови у мышей с алюминиевым нейротоксикозом заметно повышался (более чем 2 раза). В супернатанте, приготовленном из гомогената тимуса мышей 1-й опытной группы (с алюминиевым нейротксикозом) определялись лишь следовые количества указанного цитокина, в то время как введение ПБП сопровождалось тенденцией, направленной в сторону нормализации содержания ИЛ-1. Однако, показатели ИЛ-1 у животных второй опытной группы в 1,3 раза были ниже аналогичных показателей у интактных животных. В печени животных с алюминиевым токсикозом содержание ИЛ-1 понижалось, в то время как введение ПБП приводило к заметному повышению его уровня. В гомогенатах мозга контрольных мышей ИЛ-1 выявить не удалось. (рис.1)

При введении хлорида алюминия определено значительное количество ИЛ-1 в супернатанте мозга. Введение ПБП почти в два раза понижало уровень ИЛ-1 в мозговой ткани по сравнению с первой опытной группой. В гиппокампе животных контрольной и опытной групп ИЛ-1 определить не удалось.

Содержание ИЛ-2 в сыворотке крови, печени и мозге у мышей с алюминиевым нейротоксикозом резко понижалось (более чем два раза). Введение ПБП (в дозе 15 мкг) сопровождалось различной степенью нормализации ИЛ-2. В тимусе мышей 1-й опытной группы, по сравнению с высоким уровнем ИЛ-2 у интактных животных, имело место резкое понижение его содержания (более чем 12 раз). Введение животным ПБП сопровождалось повышением уровня ИЛ-2 в тимусе (более чем в три раза по сравнению с 1-й опытной группой), однако его содержание не нормализовалось (ниже контрольных показателей в шесть раз).

Определенный интерес представляют результаты анализа ИЛ-6. В сыворотке, тимусе (рис.3) и печени животных обеих опытных групп имело место резкое понижение его содержания, однако в гиппокампе и цельном мозге(рис.2) животных с алюминиевым нейротоксикозом и в условиях введения ПБП констатирован сравнительно высокий уровень ИЛ-6, который существенно превышал исходный контрольный уровень соответственно более чем 2 и 1,5 раза.

Следует отметить, что адекватные эффекты эндогенно активных биологических соединений обусловлены их низкими концентрациями в крови, жидких средах организма, поскольку именно подобные дозы являются максимально приближенными к концентрациям биологически активных веществ, вырабатываемых в условиях физиологического функционирования организма.

Как показали результаты иммуноферментного анализа, ПБП в обеих дозах (15 и 1,5 мкг) оказывал аналогичный эффект на уровень ИЛ-1 в тимусе и печени. При введении малых доз ПБП в сыворотке крови определялись показатели ИЛ-1, аналогичные таковым контрольной группы. Следует отметить, что введение именно низкой дозы нейропептида сопровождалось нормализацией уровня ИЛ-2 в тимусе. Не исключено, что именно подобные концентрации препарата являются наиболее эффективными, поскольку обеспечивают даже в условиях алюминиевой интоксикации оптимальный уровень ИЛ-2 в центральном органе иммуногенеза. В пользу данного обстоятельства свидетельствует и тот факт, что при введении относительно высоких доз ПБП н:аблюдалась лишь тенденция, направленная в сторону восстановления его уровня, несмотря на то, что и в данном конкретном случае был также зарегистрирован определенный нейропротекторный эффект.

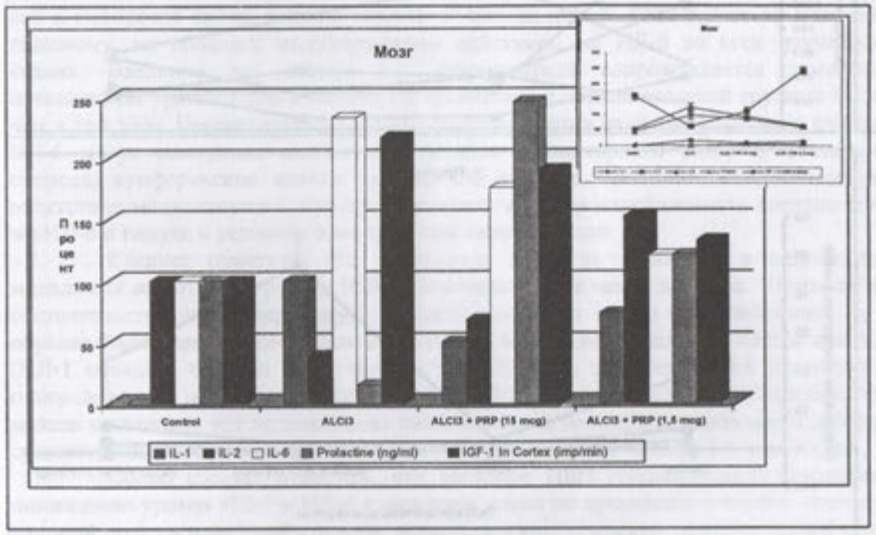

Рис. 1 Содержание иммуноцитокинов, пролактина и инсулиноподобного фактора роста (ИФР-1) в цельном мозге и коре головного мозга мышей при алюминиевом нейротоксикозе и на фоне введения ПБП.

Введение высоких концентраций ПБП не сопровождалось сдвигами со стороны содержания ИЛ-2 в печени, в то время как низкие дозы ПБП повышали уровень ИЛ-2 в печени по сравнению с контрольной группой в два раза. В данном случае четко прослеживалась тенденция, направленная в сторону нормализации указанного показателя по сравнению с контрольной группой. Необходимо

© National Library of Armenia

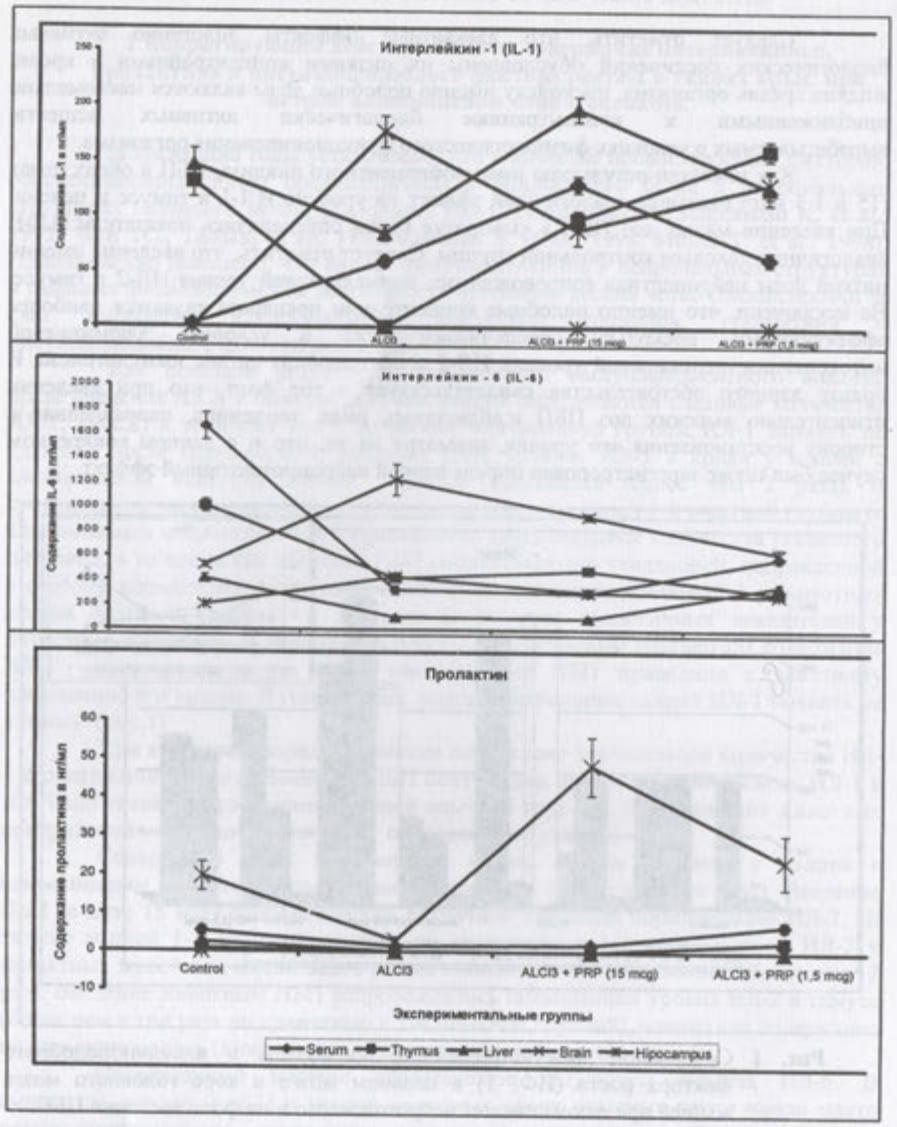

Рис. 2 Количественные сдвиги содержания ИЛ-1, ИЛ-6 и пролактина в мозге, гипокампе и во внутренних органах (тимус, печень, сыворотка крови) мышей при алюминиевом нейротоксикозе на фоне введения ПБП.

подчеркнуть, что если введение ПБП в высоких концентрациях сопровождалось нормализацией содержания ИЛ-2 в сыворотке крови, то его низкие концентрации приводили к заметному его повышению.

Поскольку ИЛ-1, вырабатываемый в мозговой ткани, выступает в качестве индуктора синтеза предшественника амилоидного белка в первичных нейронах, можно допустить, что ПБП на уровне нейрональных структур частично ингибирует процессы синтеза атипичных нейрональных белков. Об этом свидетельствует то обстоятельство, что уровень ИЛ-1 в мозговой ткани в условиях введения ПБП понижался в два раза. Результаты определения содержания ИЛ-2 также свидетельствуют в пользу его высокой биологической активности, поскольку, как было показано, во всех изучаемых органах, четко прослеживалась тенденция к нормализации его содержания. Не исключено, что иммуномодулирующее действие ПБП опосредовано также стимуляцией синтеза ИЛ-2 в лимфоидных клетках тимуса.(рис.3) Аналогичное допущение приемлимо также и в отношении нейрональных клеток, поскольку подобная тенденция наблюдалась и в мозговой ткани.

Особый интерес представляют результаты определения содержания ИЛ-6. Введение алюминий хлорида сопровождалось резким понижением его содержания как в сыворотке крови, так и в тимусе и печени.(рис.2) ПБП в дозе 15 мкг, по-видимому, не обладает модулирующим действием на ИЛ-6 во всех изучаемых тканях. Введение же низких доз нейропептида сопровождается заметным повышением уровня ИЛ-6 в печени по сравнению с первой опытной группой более чем в три раза. Именно поэтому можно полагать, что в качестве источника синтеза ИЛ-6 могут выступать клетки моноцитарно-фагоцитарного ряда, и, в первую очередь, купферовские клетки печени. Об этом, в частности, свидетельствует отсутствие модуляторного эффекта препарата в плане направленного синтеза того же ИЛ-6 в тимусе в условиях алюминиевой интоксикации.

Следует отметить, что в цельном мозге и, особенно, в гиппокампе модельных животных, уровень ИЛ-6 повышался более чем в два раза. Учитывая то обстоятельство, что гиперпродукция вырабатываемых in situ интерлейкинов 1 и 6 обуславливает синтез атипичных амилоидных белков нейрональных клеток при БА (ИЛ-1 обладает прямым стимулирующим эффектом, а эффект ИЛ-6 реализуется опосредованно, путем ингибиции синтеза ИФР-1), с определенной уверенностью можно заключить, что используемая нами модель в целом, воспроизводит наиболее существенные иммунопатогенетические звенья развития и течения БА у человека.

Особо следует отметить, что введение ПБП способствовало заметному понижению уровня ИЛ-1 и ИЛ-6 в мозговой ткани по сравнению с первой опытной группой, что, в известной степени, свидетельствует о важной модулирующей роли исследуемого нейропептида в процессах нейроэндокринной регуляции ЦНС и его иммуномодуляторной роли в условиях патологии, в том числе, в аспекте торможения каскада региональных иммунопатологических реакций, обуславливающих в конечном итоге, синтез аномальных пептидов при нейродегенеративных заболеваниях ЦНС, включая БА и болезнь Паркинсона и т.д.

© National Library of Armenia

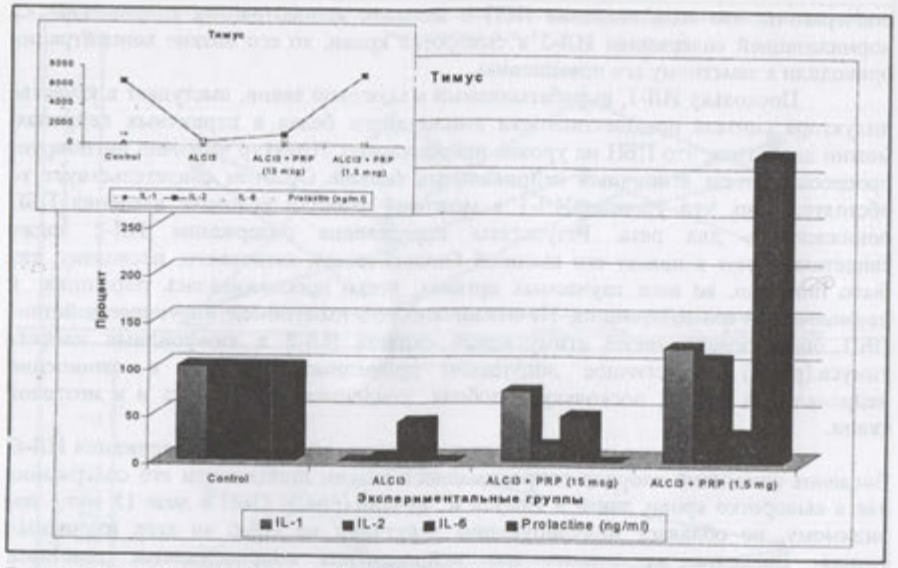

Рис. 3 Содержание цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2 и ИЛ-6) и пролактина в тимусе мышей при алюминиевом нейротоксикозе и на фоне введения ПБП.

Не исключено, что направленный иммуномодуляторный эффект ПБП реализуется также нейроэндокринными механизмами. В указанном плане особое место должно быть уделено гипофизарному пролактину, который, как в ЦНС, так и в органах иммуногенеза обладает иммуномодуляторным действием, обуславливая направленный синтез широкого спектра цитокинов.

Полученные результаты свидетельствуют, что иммуномодуляторный эффект пролактина на периферии отсутствует. Во всех изучаемых группах выявлена зависимость между низким уровнем пролактина в сыворотке крови, тимусе и печени. Особо следует подчеркнуть то обстоятельство, что в мозге у мышей с алюминиевым нейротоксикозом содержание пролактина (рис.1) также понижалось (более чем в 6 раза), однако введение ПБП приводило к резкому повышению его содержания, в 2,7 раза превышающий контрольный уровень. Таким образом, можно предположить, что ПБП обладает модулирующим действием на нейроэндокринные структуры гипофиза, прямо и/или косвенно стимулируя направленный синтез пролактина.

Как видно из рис.1, при введении раствора $AlCl_3$ содержание ИФР-1 в коре головного мозга понижалось примерно в 2,2 раза по сравнению с нормой. В случае введения малых доз ПБП (1,5мкг) содержание ИФР-1 значительно повышалось по сравнению с группой животных, получавших хлорид алюминия. Тенденция к нормализации была отмечена в основном при применении малых доз гипоталамического нейропептида. Результаты иммуноферментного анализа не выявили каких либо определенных изменений в содержании ИФР-1 в сыворотке

крови у животных опытных групп по сравнению с контрольной группой. Не исключено, что выявленные эффекты ПБП в плане реализации нейропротекторных и иммуномодуляторных свойств на периферии опосредованы процессами нейрогормональной активации ЦНС, о чем косвенно свидетельствуют полученные данные относительно изменений уровня ИФР-1.

2. Эффекты ПБП на уровень металлопротеинов и малонового диальдегида при остром алюминиевом нейротоксикозе.

Целью этой серии экспериментов является одновременное определение количественных сдвигов про- и антиоксидантных металлопротеинов в крови крыс, цитохрома B_5, СОД, каталазы и МДА в цельном мозге, гиппокампе и в печени животных при ОАН и при использовании различных доз ПБП с лечебной целью.

В первой серии исследования использовались белые половозрелые крысы (180 - 200г). Животных разделяли на три группы по 10 животных в каждой: животные, получавшие внутрибрюшинно 0,2 мл физ.р-ра на первый и третий день эксперимента (контрольная группа, К); животные, получавшие подкожно 0,2 мл 10% $AlCl_3$ в аналогичном режиме (опытная группа, ОГ-1) и животные, получавшие $AlCl_3$ в приведенном режиме, получали также внутрибрюшинно 15 мкг ПБП на шестой и девятый день эксперимента (ОГ-2).

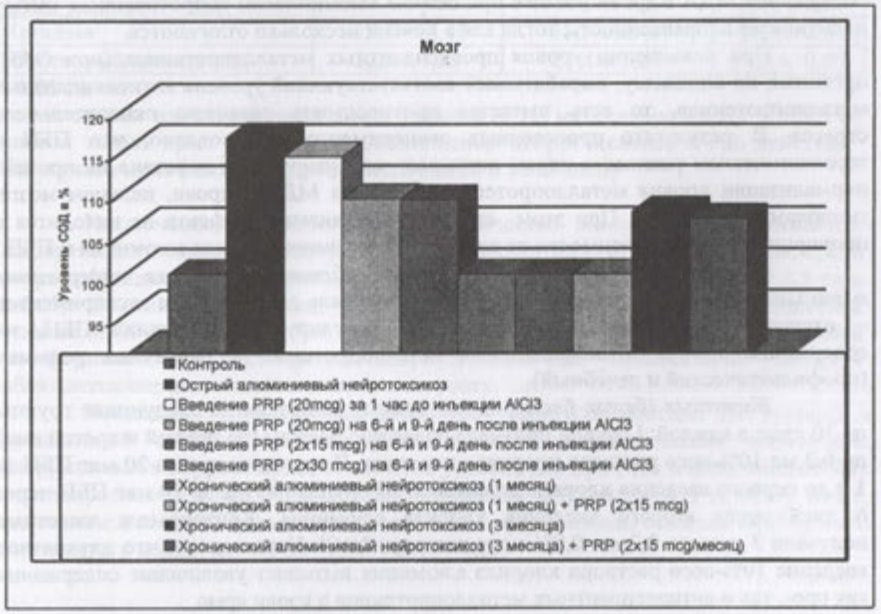

Рис. 5 Влияние ПБП на активность СОД в мозге крыс при алюминиевом нейротоксикозе.

© National Library of Armenia

Во второй серии эксперимента были увеличены в 2 раза содержания вводимого физраствора, (K^1), $AlCl_3$ ($ОГ^1$-1) и ПБП ($ОГ^1$-2). Условия проведения эксперимента в обеих сериях одинаковы.

Установлено, что при двукратном введении хлорида алюминия наблюдается увеличение уровней как прооксидантных, так и антиоксидантных металлопротеинов крови, кроме супрола, уровень которого понижался почти вдвое (Табл. 1). При этом в ОГ-1 наблюдается резкое увеличение уровня сывороточных цитохромов B_{558} и, особенно, каталазы в растворимой фракции эритроцитов, что свидетельствует о повышении в крови уровня перекиси водорода. Одновременно наблюдается повышение уровня сывороточных цитохромов B_{558}-I и B_{558}-II (особенно B_{558}-II из сыворотки крови крыс). Увеличение уровня цитохромов B_{558} свидетельствует об изменениях микроструктур эритроцитарных мембран при алюминиевом нейротоксикозе. В этих условиях, оказывающий антистрессорный эффект ПБП положительно действует при ОАН, несколько приближая приведенные показатели к норме, хотя и в этом случае уровень каталазы в крови остается выше нормы, тогда как в печеночной ткани она заметно снижена.

Двукратное повышение дозы $AlCl_3$ в крови крыс вызывает несколько отличные изменения эндогенных метоллопротеинов в $ОГ^1$-1, (табл. 1) где уровень суммарной фракции эритроцитарных мембранных цитохромов B_{558} повышен на 75%, хотя общий уровень цитохромов B_{558} III и B_{558} IV в ОГ-1 и $ОГ^1$-1 почти равны. Динамика активности антиоксидантных ферментов СОД и каталазы, а также содержания МДА в крови и мозге при остром алюминиевом нейротоксикозе имеют идентичную направленность, тогда как в печени несколько отличаются.

При повышении уровня прооксидантных металлопротеинов (при ОАН) организм, по-видимому, вырабатывает соответствующий уровень антиоксидантных металлопротеинов, то есть пытается противостоять развитию окислительного стресса. В результате проведенных экспериментов установлено, что ПБП в терапевтическом режиме в целом оказывает корригирующее действие на процесс нормализации уровня металлопротеинов и уровня МДА в крови, цельном мозге, гиппокампе, и печени. При этом степень нормализации эффекта не находится в пропорциональной зависимости от количеств вводимого хлорида алюминия и ПБП.

Протекторное и корригирующее действия ПБП на содержание металлопротеинов и малонового диальдегида. Цель данной серии экспериментов – изучение на модели нейродегенерации регулирующего влияния ПБП, на содержание про- и антиоксидантных металлопротеинов в различных режимах (профилактический и лечебный).

Животных (белые беспородные крысы) разделяли на следующие группы по 10 крыс в каждой: I группа получала подкожно дважды (на первый и третий дни) по 0,2 мл 10%-ного раствора хлорида алюминия, II группа получала 20 мкг ПБП за 1 ч до первого введения хлорида алюминия, III группа получала 20 мкг ПБП через 6 дней после второго введения хлорида алюминия. Контрольные животные получали 3 раза по 0,2 мл 0,9%-ного раствора NaCl. Установлено, что двукратное введение 10%-ного раствора хлорида алюминия вызывает увеличение содержания как про-, так и антиоксидантных металлопротеинов в крови крыс.

Таблица 1

Металлопротеины	ОГ-I	ОГ-II	$ОГ^1$-III
Цитохром B_5	63,4 ± 4,28	53,3 ± 2,8	48,1 ± 2,79
Σ цитохромов B_{558} из мембран эритроцитов	36,5 ± 1,39	28,6 ± 2,06	15,7 ± 1,2
Σ цитохромов B_{558}-I и B_{558}-II.	88,9 ± 4,59	73,6 ± 5,81	56,4 ± 3,46
Цитохром B_{558}-III	71,3 ± 4,37	55,9 ± 2,82	44,8 ± 3,26
Цитохром B_{558}-IV	61,1 ± 3,79	49,9 ± 2,80	38,7 ± 1,63
Супрол	-52,4 ± 2,47	-39,6±1,35	-32,8 ± 1,64
$0^{\cdot}_2$ –продуцирующая активность супрола	24,5 ± 0,86	10,1 ± 0,45	12,2 ± 0,60
Церулоплазмин	25,1 ± 1,6	19,1±1,29	16,2 ± 0,89
Трансферрин	67.1 ± 4,11	58,3 ± 2,95	47,5± 1,68
СОД	54,1 ± 3,67	41,3 ± 2,05	36,4 ± 2,22
Каталаза	350,8 ± 27,89	287,5± 12,89	205,4 ± 15,4
Мозг			
СОД	16,5 ± 0,97	14,2 ± 1,2	9,1 ± 0,54
Каталаза	5,1 ± 0,37	4,9 ± 0,24	5,5 ± 0,29
Малоновый диальдегид	11,4 ± 0,78	9,5 ± 0,61	5,1 ± 0,38
СОД	-21,1 ± 0,89	-16,3 ± 1,32	-12,1 ± 0,66
Каталаза	-75,1 ± 4,49	-61,9 ± 25,07	-38,7 ± 2,67
Малоновый диальдегид	32,3 ± 1,23	21,4 ± 1,25	17,5 ± 0,69

$P<0,05$ $n = 6$

Относительные изменения эндогенных уровней (в %) металлопротеинов и МДА в крови и тканях крыс при остром алюминиевом нейротоксикозе и при действии ПБП в различных режимах (профилактический и лечебный).

Исключение составляет супрол, количество которого резко снижается. Одновременно повышается содержание антиоксидантных металлопротеинов, среди которых обращает на себя внимание каталаза: активность ее возрастает в 3,5 раза (табл.1). В отличие от крови, в печени и гиппокампе наблюдается снижение активности СОД и каталазы. Что касается мозга, то особых изменений в активности этих ферментов при алюминиевом нейротоксикозе нам установить не удалось – наблюдается определенная тенденция к их росту.

Предварительное (профилактическое) введение пептида (II группа) в определенной степени предотвраща:ет развитие метаболических нарушений, обнаруженных в I группе крыс. Снижается уровень как про-, так и антиоксидантных металлопротеинов крови. Аналогичные изменения наблюдаются в цельном мозге, гиппокампе и печени. При исследованиях более эффективным оказался ПБП при его применении с корригирующей целью (III группа)

© National Library of Armenia

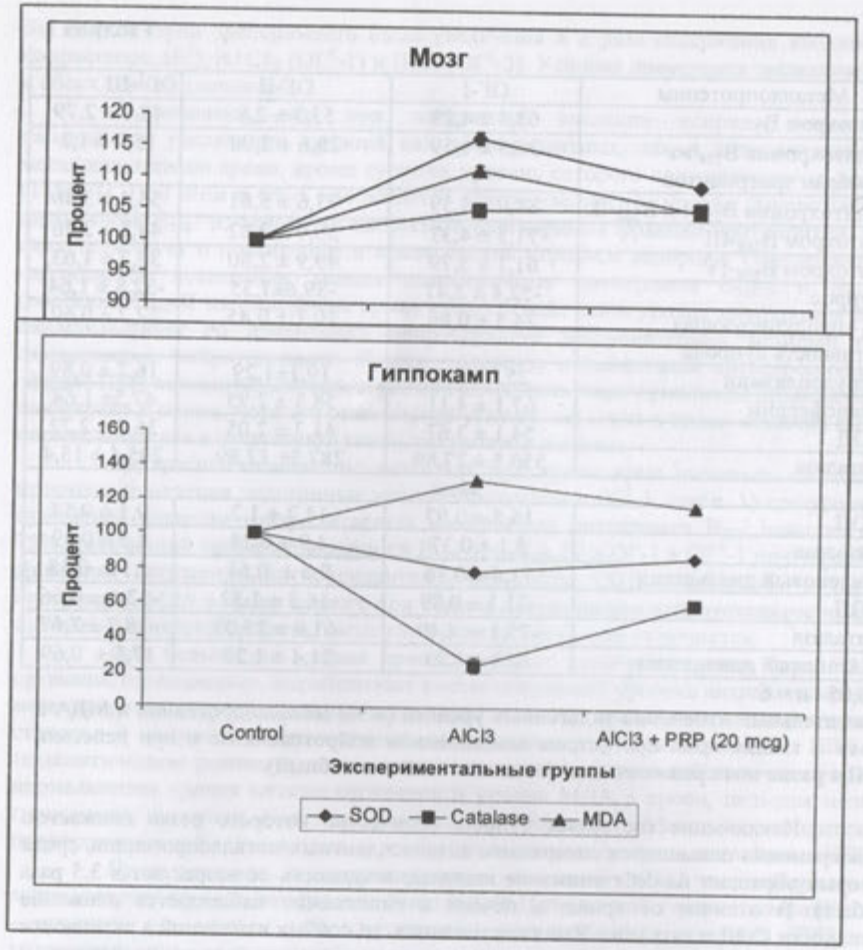

Рис. 5 Количественные сдвиги антиоксидантных металлопротеинов (СОД и каталаза) и МДА в мозге и гиппокампе при остром алюминиевом нейротоксикозе.

. Введение ПБП через 6 дней после последней инъекции хлорида алюминия оказало на уровень ПОЛ и содержание металлопротеинов в крови и тканях (рис.5) более выраженный нормализующий эффект. Таким образом, в данном эксперименте ПБП проявляет себя как регулятор с широким спектром действия.

3. ПБП – как нейропротектор, модулирующий степень окислительного повреждения тканей при хроническом алюминиевом нейротоксикозе.

Целью этой серии экспериментов является определение количественных характеристик оксидативного повреждения компонентов крови и других тканей крыс при 3-х месячном хроническом алюминиевом нейротоксикозе (ХАН) и под влияние5м нейроактивного пролин-богатого синтетического пептида.

ХАН вызывали путем перорального введения р-ра 10 % $AlCl_3$ в течении 3-х месяцев. Животные были обьеденены в три группы: I - контрольная группа получала 0,2 мл физиологического раствора в/б через каждые 15 дней; вторая – получала с питьевой водой 10% хлорид алюминия и 0,2 мл физ. раствора в/б через каждые 15 дней; третьей группе животных вместо физ. раствора вводили 20 мкг ПБП в 0,2 мл физ. р-ре на фоне хронического алюминиевого нейротоксикоза.

В результате трехмесячного ХАН в исследованных тканях крыс содержание про- и антиоксидантных металлопротеинов, а также уровень липидной пероксидации изменяется неоднозначно. В крови на фоне увеличения уровня цитохромов B_5, B_{558} III, B_{558} IV происходит снижение сывороточных цитохромов B_{558} I + B_{558}II и супрола, хотя $O_2^{\cdot}$ - продуцирующая активность супрола возрастает. Активность СОД растворимой фракции эритроцитов снижается, что компенсируется резким повышением каталазной активности. Нетрудно заметить, что при ХАН за счет активации каталазы суммарный прирост уровня антиоксидативных металлопротеинов более чем в три раза превосходит содержание прооксидантных металлопротеинов крови. Этот факт свидетельствует о нарушении при ХАН физиологического баланса между продуцирующими и утилизирующими $O_2^{\cdot}$ металлопротеинами. В крови низкий уровень супероксидных радикалов может способствовать замедлению окислительно-восстановительных процессов протекающих с участием $O_2^{\cdot}$. С другой стороны, резкое повышение активности каталазы свидетельствует об увеличении при ХАН уровня H_2O_2, которая, по-видимому, образуется иным путем, нежели за счет ферментативного дисмутирования $O_2^{\cdot}$.

При ХАН в тканях цельного мозга, гиппокампа, печени и сердца активность Cu,Zn-СОД ощутимым изменениям не подвергается. Что касается каталазы, то активность ее снижается в печени, тогда как в других органах, и в первую очередь в цельном мозге возрастает. Содержание цитохрома С незначительно повышается в печени, снижаясь в сердечной и мозговой тканях, что свидетельствует об определенных нарушениях нормального течения митохондриального окисления при ХАН. Содержание МДА, снижаясь в печени, сердце и гиппокампе, в цельном мозге, наоборот, возрастает.(рис.6) Учитывая повышенную активность каталазы в цельном мозге, не исключается, что в последнем повышается и уровень H_2O_2, которая, наряду с $O_2^{\cdot}$, способствует инициации липидной пероксидации.

Под воздействием ПБП на фоне ХАН в подавляющем большинстве показатели крови приближаются к норме, за исключением ЦП и ТФ, значения которых достаточно понижаются по сравнению с контролем. Следует отметить, что при действии ПБП резко снижается содержание МДА в мозговой ткани достигая ниже контрольного уровня.

© National Library of Armenia

Одномесячный ХАН вызывали у белых крыс путем пероральной подачи 10%-ого раствора хлорида алюминия вместе с питьевой водой в течение 30 дней. Животные были разделены на три группы: животные, получавшие по 0,2 мл физраствора подкожно, через каждые 15 дней опыта, 2 раза (контрольная группа), в опытной группе –1 (ОГ-1) животным давали 10% $AlCl_3$ вместе с питьевой водой, одновременно с 0,2 мл физраствора через каждые 15 дней. В ОГ-2 животные получали $AlCl_3$ также, как в ОГ-1, вместо физраствора получали по 20 мкг ПБП (в 0,2 мл физ.р-ре) также два раза.

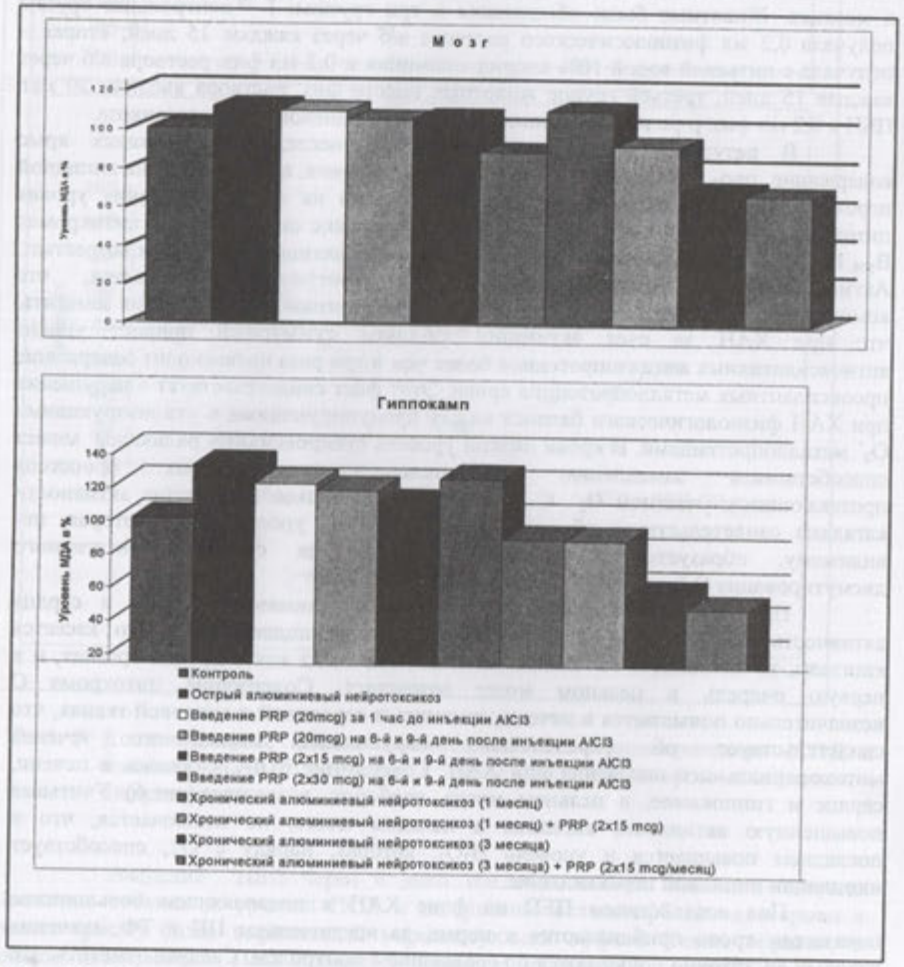

Рис. 6 Влияние ПБП на уровень МДА в мозге и гиппокампе крыс при алюминиевом нейротоксикозе.

По сравнению с контрольными показателями в ОГ-1 в большинстве наблюдается понижение уровня цитохром B_5, цитохромов B_{558}I и B_{558}II, и супрола в среднем на 25-54%, атакже ЦП и ТФ, хотя уровень СОД практически не изменяется. На этом фоне уровень цитохромов B_{558} повышается, а уровень каталазы и O_2^- продуцирующая активность супрола остается в пределах контроля. В ОГ- 1 в результате одномесячного ХАН наблюдается понижение не только уровня СОД и каталазы, но и уровень липидной пероксидации в гомогенатах печеночной ткани. При этом если активность фракции СОД и каталазы в цельном мозге не изменяются, то уровень МДА несколько возрастает. (рис.6) В гиппокампе же уровень СОД падает незначительно, а уровень каталазы не изменяется, наблюдается также некоторое понижение уровня МДА. (рис.6)

В ОГ-1 понижение в крови уровней прооксидантных металлопротеинов цитохромов:B_5, B_{558}I и B_{558}II, а также супрола несколько компенсируется повышением уровней эритроцитарных мембранных цитохромов B_{558}. Цитохромы B_{558}I-IV способны продуцировать O_2^-, путем переноса электрона NADPH к молекулярному кислороду, как это свойственно другим известным цитохромам B_{558}, локализованным, например, в мембранах фагоцитирующих лейкоцитов.

В ОГ-2 в крови под воздействием ПБП происходит приближение уровней цитохрома B_5, супрола, ЦП, каталазы к норме, хотя уровни цитохромов B_{558}I и B_{558}II продолжают понижатся, а уровни эритроцитарных мембранных цитохромов B_{558} повышаются. Уровни же СОД, каталазы и O_2-продуцирующая активность супрола практически не изменяются. ПБП в печени приводит к резкому повышению активности каталазы и к нормализации уровня СОД, уровень МДА при этом ощутимо падает. В мозговой ткани в ОГ-2 уровень СОД и каталазы не изменяются, однако уровень МДА несколько падает. В гиппокампе же в ОГ-2 активность СОД повышается, при этом не наблюдается изменений в активности каталазы, а уровень МДА продолжает снижаться (рис.6).

При одномесячном ХАН нарушение физиологического равновесия активности ключевых антиоксидантных ферментов и липидной пероксидации в печени, мозге и гиппокампе фактически происходит в соответствие с изменением уровней анти- и прооксидантных систем крови. В частности, резкие изменения уровней антиоксидантной системы и ПОЛ отсутствуют в этих тканях. Возможно, это связано с некоторым снижением уровня O_2^-, который, в свою очередь, может проявить токсичность к приведенным биосистемам и инициировать процесс ПОЛ биосистем.

Одним из механизмов действия ПБП по-видимому является коррекция уровня прооксидантных металлопротеинов-цитохромов B_{558} I-IV, которые являются НАДРН – зависимыми O_2^--продуцирующими системами, локализованными в сыворотке крови (цитохромы B_{558} I и B_{558} II) и мембранных эритроцитов. Одновременно существенно, что аналогичного типа цитохромы B_{558}, локализованные в мембранах β и Т лимфоцитов и фагоцитирующих лейкоцитов [Yu L. et al, 1997, Batot G. et al, 1998] нейтрализуют антигены, продуцирующие O_2^- (и их производных), что рассматривается в качестве одного из механизмов иммунной защиты организма. Кроме этого сывороточные цитохромы B_{558} I и B_{558} II обнаруживают высокую резистентность в отношении H_2O_2, более того, они

© National Library of Armenia

защищают биосистемы крови от повреждающих эффектов H_2O_2 [Симонян М.А. и др., 1999]. По-видиму, иммуномодулирующий эффект ПБП [Galoyan A.A. et al, 2000] обусловлен и регулированием уровней цитохромов B_{558} при ХАН.

Можно заключить, что при хроническом алюминиевом нейротоксикозе возникает определенный дисбаланс между содержанием металлопротеинов и регуляторов метаболизма активных форм кислорода, который в определенной степени регулируется возможно антиоксидантным механизмом действия ПБП.

4. Ультраструктурные изменения в нейронах при алюминиевом нейротоксикозе: эффекты пролином богатого полипептида.

В 1980 году H.Wisniewski с соавторами с помощью электронной микроскопии показали, что для БА характерно наличие в нейронах мозга парных клеток спиральных нейрофиламентов. На культуре нейронов НГУК-1 [Полякова Г.П. и др.,1990] было изучено действие хлористого алюминия на животных при экспериментальном алюминиевом нейротоксикозе. В дальнейшем изучался хромосомный аппарат и хроматиды. [Шахламов В.А. и др., 2000]. Данные этих исследований показали, что генетический аппарат нервных клеток в присутствии хлористого алюминия не подвергается каким-либо изменениям. Он нарушает лишь сборку веретена деления и цитоплазматического комплекса микротрубочек. Алюминий проникает в клетки (нервные и эпителиальные) через ионные каналы в плазмалемме. Это явление было названо цитотезуризмом, а проникновение ионов Al через поры ядра в нуклеоплазму- нуклеотезауризмозом [Авцын А.П. и др., 1991].

Установили, что фтор препятствует повышению количества алюминия в организме у экспериментальных животных.(Kortus J., Mayer J.1999) По данным литературы при воздействии алюминия на клетку происходит ассоциирование различных вариантов трансферина (ТФ) C_1 и C_2 с определенной потерей ими способности захвата и переноса ионов железа. Последнее обстоятельство, в свою очередь, вызывает интенсификацию свободнорадикальных окислительных процессов с участием АФК в различных биоформированиях организма, в том числе и мозге [Van Landeghem G.F. etal, 1995].

Окислительное повреждение липидов, углеводов, белков и ДНК приводит к воспалительным процессам и гибели нейронов при БА [Крыжановский Г.Н. 1995]. Изменение уровня АФК в нейронах под воздействием алюминия сопровождается соответствующими гистологическими изменениями этих биосистем. Комплексное изучение гистологических изменений нервной ткани и сдвигов уровня металлопротеинов – регуляторов метаболизма АФК при алюминиевом нейротоксикозе, а также состояния перекисного окисления липидов расширит возможности выявления молекулярных механизмов алюминиевого нейрогоксикоза, как возможной модели нейродегенерации.

Целью настоящего исследования является визуализация на ультраструктурном уровне локализации молекул алюминия в различных органах млекопитающих (гиппокампе, печени, почках, тонкой кишке и желудке) и при воздействии ПБП.

Согласно данным электронно-микроскопического исследования, через 1

час после в/б введения экспериментальным животным стерильного 0.2 мл 10% раствора $AlCl_3$ в цитоплазме нейронов гиппокампа встречались нейроны с диффузным распределением отдельных частиц алюминия. Одновременно обнаруживались нейроны с мелкими глыбками зернистых электронноплотных частиц, а в некоторых из них, помимо глыбок, в цитоплазме обнаруживались диффузные проникновеня мелкозернистых частиц через ядерную мембрану (рис.7Б).

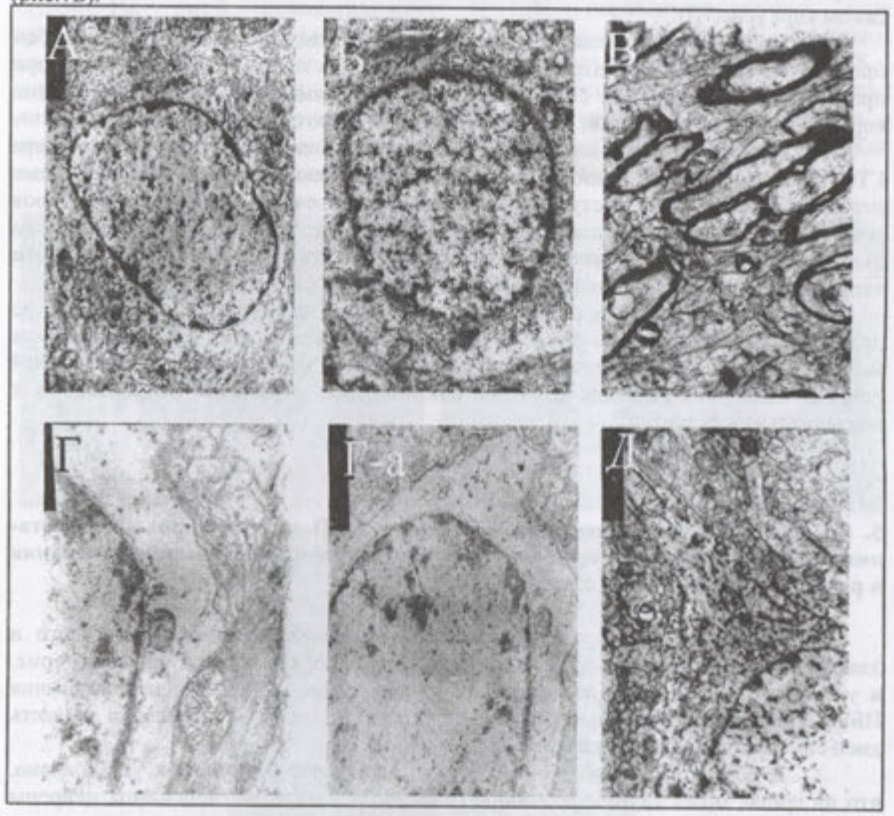

Рис.7 Нейрон гиппокампа крыс:**А**. Контроль; х10000. **Б**. Гиппокамп крысы после трехкратного введения хлорида алюминия, диффуное проникновение молекул алюминия через ядерные мембраны; х10000. **В**. Гиппокамп крысы после трехкратного введения хлорида алюминия, молекулы алюминия в миелиновых мембранах нервных волокон; х10000. **Г**. Отечный нейрон через 1 ч. после введения $AlCl_3$, увелич. 20000 **Г-а** Часть нервной клетки с отечной цитоплазмой и ядром, х14000. **Д**. Гиппокамп крысы. Нейрон после предварительного введения ПБП и трехкратной инъекции раствора хлорида алюминия, .х14000.

© National Library of Armenia

Обращает на себя внимание тот факт, что в некоторых миелиновых нервных волокнах наблюдалось сплошное пропитывание их алюминий содержащими гранулами (рис.7В).

После предварительного введения животным ПБП, в гиппокампе не обнаруживаются как нейроны с отеком цитоплазмы и ядра, так и нейроны содержащие электроноплотные гранулы и крупные включения в цитоплазме, и в самом ядре (рис.7Д).

Полученные данные свидетельствуют о том, что алюминий способен проникать в цитоплазму и ядра клеток, где вступает в контакт с ДНК и РНК, а при предварительном введении ПБП в нейронах гиппокампа, пирамидальных клеток коры большого мозга, а также в эпителиоцитах $AlCl_3$ не обнаруживается.

Известно, что на внутренней поверхности мембран клеток расположены ГТФ-связанные белки, выполняющие роль сопрягающих факторов в системе передачи информации, поступающей на внутриклеточные мишени от факторов роста (пептидов) и гормонов. При этом нарушается баланс между перекисным окислением липидов и активностью антиоксидантных систем, что является характерным для окислительного стресса.

Таким образом, удалось визуализировать некоторые морфологические проявления окислительного стресса в нейронах гиппокампа крыс при алюминиевом нейротоксикозе и одновременно подтвердить электронной микроскопией нейропротекторное действие ПБП при алюминиевом поражении нейрональных и эпителиальных структур.

5. Протекторное и корригирующее действие ПБП на индуцированные бета-амилоидным пептидом морфологические и нейрофизиологические изменения в различных структурах головного мозга.

Целью данного исследования является выявление морфологического и электорофизиологического изменений в различных сериях экспериментов в норме, в условиях интоксикации бета-амилоидным пептидом (25-35) без использования ПБП, при однократной инъекции последнего за сутки до интоксикации и шесть дней спустя после интоксикации.

В результате проведенного патоморфологического анализа установлено, что на срезах мозга группы ложнооперированных в области гиппокампа нейроны имели нормальный вид. В коре мозга и поле CA1 гиппокампа инъекции изотонического раствора NaCl и стерильной воды вызвали небольшие повреждения только в участке непосредственного введения инъекционной иглы. Только в одном случае наблюдалась значительная нейродегенерация в верхней ветви зубчатой фасции, что, по видимому, было вызвано введением воды в гиппокамп.

А. Галояном было показано, что ПБП весьма сильно связывается с амилоидным пептидом (25-35) в водной среде [Galoyan A., 2003]. По его предложению мы приступили к изучению действия ПБП на структуры мозга и его роли в предотвращении нейродегенеративных процессов.

На срезах мозга животных, получивших инъекцию βA(25-35), наблюдали значительную нейродегенерацию, наиболее выраженную в месте непосредственного попадания иглы и близлежащих областях. В поврежденной части поля CA1 гиппокампа наблюдали только сморщенные клеточные ядра или поврежденные клетки. Нейродегенерация сопровождалась выраженной реакцией глии.

На рис.8 демонстрируются клетки паравентрикулярного ядра гипоталамуса крысы в различных экспериментальных условиях: А - показаны клетки паравентрикулярного ядра (ПВЯ) гипоталамуса интактной крысы. На Б – гипертрофированные или же сморщенные, дегенерированные клетки ПВЯ крысы, инъецированной бета –амилоидным пептидом. В: клетки ПВЯ гипоталамуса у крысы, получившей однократную инъекцию ПБП до введения βA (25-35). Как видно, размеры и форма клеток совпадают с нормой (В).

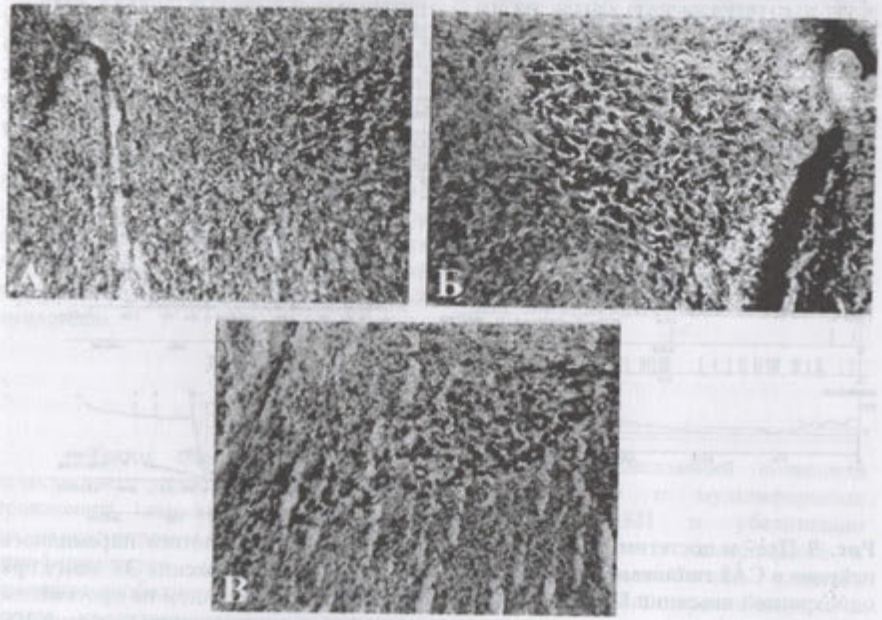

Рис. 8 А: Клетки паравентрикулярного ядра гипоталамуса интактной крысы; Ок. ×10. Об. ×10. **Б:** Дегенерированные клетки паравентрикулярного ядра крысы, инъецированной βA; Ок. ×10. Об. ×10. **В:** Клетки того же ядра гипоталамуса у крысы, получившей однократную инъекцию ПБП до введения βA. Ок. ×10. Об. ×10

Проведены также морфологические исследования, демонстрирующие клетки гиппокампа правого полушария мозга контрольной (инъецированной

© National Library of Armenia

стерильной водой) крысы. Хорошо иллюстрированы почти все извилины гиппокампального комплекса-СА1, часть СА2 (верхняя извилина), СА4, и боковые извилины зубчатой фасции. У крыс с инъекцией βА(25-35), выявлена значительная дегенерация клеток почти всех областей гиппокампального комплекса (правое полушарие мозга). Оставшиеся клетки сморщены и хорошо выделены в светлом перицеллюлярном пространстве. Как показывают результаты проведенных исследований однократное введение ПБП крысам до инъекции βА(25-35) не оказывает заметного влияния на нейродегенеративные процессы в клетках гиппокампального комплекса.

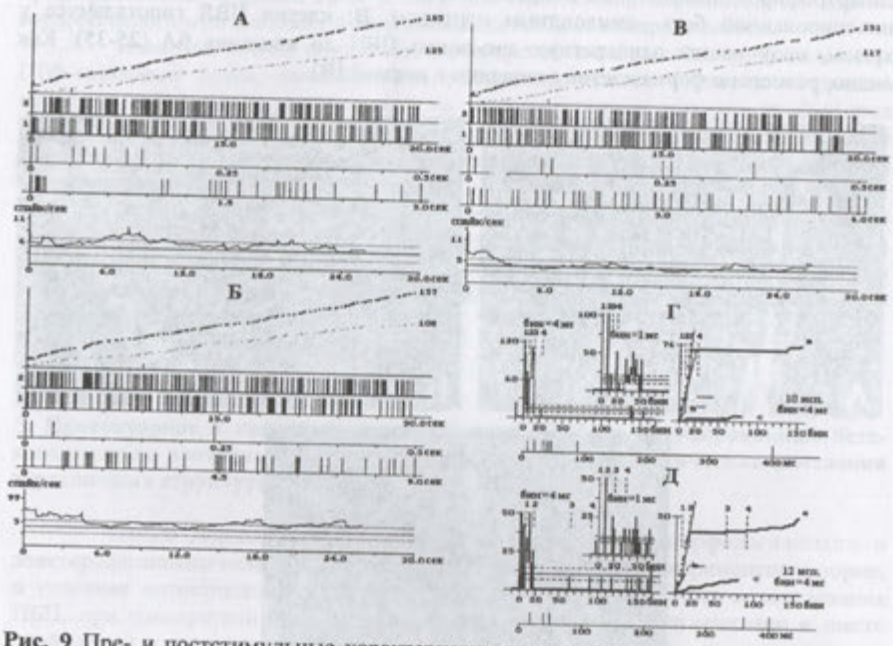

Рис. 9 Пре- и постстимульные характеристики импульсного потока пирамидного нейрона в СА2 гиппокампа в условиях частотного (А-В) раздражения ЭК мозга при однократной иньекции ПБП за сутки до интоксикации β-амилоидом на протяжении 6 нед. Тетаническая и посттетаническая потенциация при стимуляции частотой 100 Гц в течение 1 сек (А), 0.5 сек (Б) и 0.2 сек (В). Кумулятивные гистограммы на одиночное раздражение ЭК мозга до (Г) и после ее тетанизации (Д).

Представлены результаты электрофизиологического исследования изменения частоты спайковой активности единичных нейронов гиппокампа при одиночном и частотном раздражении энторинальной коры мозга (ЭК) того же полушария мозга в норме, при интоксикации βА(25-35), при однократном введении ПБП за сутки до интоксикации β-амилоидом и при однократном введении ПБП на 6 сутки после интоксикации β-амилоидом.

Установлено, что у интактных животных нейроны гиппокампа на тетаническую стимуляцию ЭК отвечают тетанической (на время стмуляции) и посттетанической потенциацией, в ряде случаев сопровождаемой постетанической депрессией различной длительности.

В условиях интоксикации β-амилоидом налицо явное несоответствие по уровню и форме активности гиппокампальных нейронов по сравнению с нормой, свидетельствующее о скудости активности в целом и об отсутствии определенной, как тетанической, так и посттетанической активности, связанной с ожидаемым дефицитом нейромедиатора, по-видимому – ацетилхолина.

В условиях введения ПБП за сутки до интоксикации β-амилоидом при раздражении ЭК частотой 100 Гц 1 сек в нейроне гиппокампа после начальной активации до 150 мс наступало длительное торможение до 1 сек, затем активность соответствовала ФА с небольшим превышением ее уровня (А). При стимуляции 100 Гц 0.5 сек картина соответствовала ФА с незначительным превышением среднего уровня (Б). То же наблюдалось при раздражении 100 Гц 0.2 сек (В). На кумулятивной гистограмме при одиночной стимуляции до тетанизации возникала первичная активность с 8 до 55 мс, затем наступало длительное торможение до 550 мс (Г). Кумулятивная гистограмма после тетанизации демонстрирует аналогичную картину, но с восстановлением активности после 250 мс (Д).(рис.9).

При однократном применении ПБП за сутки до интоксикации не выявляется определенное улучшение в постстимульных проявлениях активности нейронов гиппокампа, в то время как при однократном использовании ПБП 6 суток спустя наблюдается очевидное улучшение в формировании как тетанических, так и посттетанических проявлений активации и депрессии нейронов гиппокампа, приближающихся к норме и свидетельствующих о снятии интоксикации β-амилоидом.

* * *

Таким образом, результаты проведенных исследований позволили качественно дополнить существующие представления о мультиформных проявления высокой биологической активности ПБП и убедительно продемонстрировать наличие у исследуемого нейропептида центрального и периферического иммуномодулирующего действия, способности угнетать процессы свободнорадикального поражения мозга, липидной пероксидации, и в целом предотвращать и корригировать нейродегенеративные повреждения головного мозга.

© National Library of Armenia

ВЫВОДЫ

1. Пролин-богатый полипептид (*ПБП*) обнаруживает способность оказывать корригирующее и протекторное действие на лимитирующие механизмы развития нейрохимических, нейрогормональных, иммуномодуляторных и морфо-функциональных нарушений при алюминиевом нейротоксикозе и интрацеребровентрикулярном введениии агрегированной формы β-амилоидного пептида.
2. Доказано центральное иммуномодулирующее действие *ПБП* - способность разнонаправленно стимулировать или подавлять при экспериментальном алюминиевом нейротоксикозе в цельном мозге, гиппокампе и коре больших полушарий продукцию различных представителей класса иммуноцитокинов (*интерлейкинов*), инсулиноподобного фактора роста (*ИФР-1*) и пролактина.
3. При алюминиевом нейротоксикозе в цельном мозге повышается уровень *ИЛ-1*, выраженно уменьшается содержание *ИЛ-2*, отмечается отчетливый рост уровня *ИЛ-6*, количество которого параллельно возрастает и в гиппокампальных структурах, в коре больших полушарий определяется повышенное содержание *ИФР-1*. Введение малых количеств *ПБП* способствует снижению уровня *ИЛ-1*, нормализации содержания *ИЛ-2* в мозговой ткани, уменьшению более чем двукратно повышенного содержания *ИЛ-6* в тотальном мозге и гиппокампе и восстановлению уровня *ИФР-1* в корковых структурах.
4. При введении ПБП в тимусе отмечается восстановление уровня *ИЛ-1*, с одновременным увеличением резко пониженного содержания *ИЛ-2* на фоне отсутствия существенных изменений со стороны уровня *ИЛ-6*.
5. Введение ПБП в печени приводит к повышению уровня *ИЛ-1*, и, особенно *ИЛ-2;* при этом, содержание *ИЛ-6*, резко сниженного в условиях алюминиевого нейротоксикоза, не подвергается существенным изменениям при введении большей дозы нейропептида (15 мкг), отчетливо возрастая при воздействии его минимальных доз (1,5 мкг).
6. Под влиянием больших концентраций *ПБП* в сыворотке крови при алюминиевом нейротоксикозе отмечается повышение содержания *ИЛ-1* и *ИЛ-2;* особенно выраженно проявляется иммуномодулирующий эффект нейрогормона в отношение *ИЛ-2* при низких дозах препарата. Последние повышают резко сниженный у животных с экспериментальным нейротоксикозом уровень *ИЛ-6*, нормализуя в сыворотке крови содержание *ИФР-1*.
7. Установлена способность *ПБП* предупреждать и корригировать развивающиеся при алюминиевом нейротоксикозе расстройства со стороны сбалансированной системы про- и антиоксидантных металлопротеинов крови, предупреждать и/или нивелировать различные проявления *оксидативного стресса*.
8. ПБП в значительной степени предотвращает наблюдаемые при алюминиевом нейротоксикозе некоторые ультраструктурные проявления нейродегенерации, выражающиеся в диффузном распределении в цитоплазме некоторых нейронов гиппокампа отдельных частиц алюминия, обнаружения нейронов с мелкими

глыбками зернистых элктронноплотных телец, диффузном проникновении мелкозернистых частиц через ядерную мембрану.
9. Установлена способность *ПБП* предупреждать индуцированные интрацеребровентрикулярным введением (*в боковые желудочки мозга*) фрагмента β-амилоидного пептида (*25-35*) нейродегенеративные изменения, развивающиеся в нейронах гиппокампального комплекса, магноцеллюлярных (*супраоптического и паравентрикулярного*) ядер гипоталамуса, нейрональных клетках мотороной и лимбических зон коры больших полушарий.
10. Результаты проведенных биохимических, иммунологических, нейрофизиологических и морфологических исследований убедительно свидетельствуют о наличии у *ПБП выраженного нейропротекторного* действия.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Агаджанов М.И., Ваградян А.Г. «Нейрохимические аспекты болезни Альцгеймера.» Вопр. теорет. и клинич. Медицины. 1999, т.2, №12 (19), стр. 8-12.
2. Агаджанов М.И., Ваградян А.Г., Симонян М.А., Галоян А.А. «Влияние обогащенного пролином синтетического пептида на содержание металлопротеинов и перекисное окисление липидов у крыс при алюминиевом нейротоксикозе (модель болезни Альцгеймера)», ж.Нейрохимия, 2000, т. 17, №4, стр. 294-297.
3. Vahradyan H.G., Aghajanov M.I., Simonyan M.A., Shakhlamov V.A. "The role of neuroactive 5proline rich prptide (PRP) in the process of elimination of oxidative damage in rat brain and other tissuse." Third confer. IBRO, Yerevan, 2000, p. 74-75.
4. Agadjanov M.I., Galoyan A.A., Vahradyan H.G. "Aluminous model of Alzheimer's disease and neurohormonal correction" J. of Neurochemistry, v. 77, suppl.1, 2001. ESN confer, p. 19-20, Italy.
5. Galoyan A.A., Vahradyan H.G., Agadjanov M.I., Simonyan M.A."Neurohormonal protection of rat oxidative stress induced by $AlCl_3$ (Alzheimer's disease model)". IBC's 9-th Annual confer. on AD, Atlanta, USA, 2001, p.71.
6. Vahradyan H.G. "The changes of the endogenous levels of antioxidant, and preoxidant action metalloproteins and malonedialdehide in the blood, liver, brain and hippocamp of the rats after chronic aluminum intoxication. The regulating effect of neuroactive PRP". Gordon Research Conf. M. Kingston, "Metals in Biology ", USA, PN-1144470, 2001.
7. Ваградян А.Г. «Протекторное действие нейроактивного пептида – галармина на тканевой уровень металлопротеинов при хронической алюминиевой интоксикации». 6-й съезд Арм. Физиол.Общества (Доклады), Ереван, 2001, стр. 88-90.
8. Agadjanov M.I., Vahradyan H.G., Zilfyan A.V., Avakian S.A., Galoyan A.A. "Interaction if new brain cytikine PRP with intrleukines of different organs of mice".

© National Library of Armenia

Proc. Interact. Confer. – Biochemical and molecular-biological aspects of brain system. Tsakhkadzor, (RA) 2001, p. 82-85.
9. Агаджанов М.И., Ваградян А.Г. «Коррекция галармином некоторых нейрохимических показателей при алюминиевой модели болезни Альцгеймера». Материалы V научной сессии «Биологич. Активные вещества в медицине». Ереван, 2001, стр. 3-6.
10. Агаджанов М.И., Ваградян А.Г., Симонян М.А., Галоян А.А. «Содержание металлопротеинов у крысс при остром алюминиевым нейротоксикозе – предполагаемой модели болезни Альцгеймера.» Всеармейская военно-врачебная научно-практич. Первая конференция. Ереван, 2001, т. 2, стр. 522-529,
11. Ваградян А.Г. «Влияние ПБП на уровень металлопротеинов и содержание МДА в први, печени, мозге и гипокампе крысс при хронической алюминиевой интоксикации.» Всеармейская военно-врачебная научно-практич. первая конференция. Ереван, 2001, т. 2, стр. 529-535,
12. Agadjanov M.I., Vahradyan H.G., Galoyan A.A. "The correction of oxidative stress in aluminum model of Alzheimer's disease by the novel hypothalamic neuropeptide." Advances in Gerontology. Intern.Conf., S.Petersburg, 2001, v. 6, p. 41
13. Ваградян А.Г «Галармин подавляет синтез амилоид предшествующего белка на экспериментальной алюминиевой модели болезни Алцгеймера.» Мед.Наука Армении, 2002, №1, стр. 22-27
14. Агаджанов М.И., Ваградян А.Г., Симонян М.А., Галоян А.А. «Регулирующий эффект PRP при окислительном стрессе на модели болезни Алцгеймера.» Сборник докладов., VI Межд. Конф. Биоантиоксидант. 2002, стр. 18-19, Москва.
15. Шахламов В.А., Галоян А.А., Полякова Г.Н., Ваградян А.Г., Симонян М.А., Агаджанов М.И., Богданова И.М., Алтухова В.И., Кондакова Л.И. «Ультраструктурные эквиваленты алюминиевого токсикоза под влиянием пролин богатого пептида гипоталамуса». Доклады НАН РА, 2002, т. 102, № 2, стр. 166-172.
16. Ваградян А.Г.«Возрастные изменения уровней металлопротеинов антиоксидантного и прооксидантного действия в крови крыс». ж. Проблемы старения и долголетия, 2002, 11, № 1 , стр.30-35,
17. Agadjanov M.I., Vahradyan H.G., Zilfyan A.V., Avakian S.A., Galoyan A.A. "Interaction of new brain cytokine with interleukines of different organs of mice under aluminum toxicosis." Нейрохимия, 2002, т.19, № 3, стр. 232-234
18. Agadjanov M.I., Zilfyan A.V., Simonyan M.A., Vahradyan H.G., Ashotyan A.G., Galoyan A.A. "The protective action of proline-rich polypeptide at alumunous neurotoxicosis." 18-th International conference of AD. Spain, Barselona, 2002, p.152.
19. Agadjanov M.I., Vahradyan H.G., Zilfyan A.V., Galoyan A.A. "Interaction of new brain cytokine with interleukines of different organs of mice in the model Alzheimer's disease" 18-th International conference of AD. Spain, Barselona, 2002, p.152.

20. Aghajanov M.I., Yenkoyan K.B., Vahradyan H.G., Galoyan A.A., Ashotyan A.G., "The antioxidant and neuroprotective action of PRP in aluminum neurotoxicosis". Frontiers in Neurodegenerative Disorders and Aging: Fundamental aspects, Clinical Perspectives and New Insights, Antalya, 2003, p.66-67.
21. Ваградян А.Г. «Введение пролином богатого пептида нормализует биохимические сдвиги в тканях крыс при экспериментальном остром алюминиевом нейротоксикозе», Пробл. старения и долголетия, 2003, 12, №1, стр.27-34,
22. Ваградян А.Г, Ваградян В.Г., «Новый подход к пониманию процессов моделирования», Биол. Ж.. Армении, 1-2 (55), 2003, стр. 166-169.
23. Ваградян А.Г, «Обогащенный пролином пептид (галармин) – нейропротекторный модулятор окислительного повреждения при хронической алюминиевой интоксикации». Нейрохимия, 2003, т.20, №2, стр. 139-142.
24. Галоян А.А, Агаджанов М.И., Ваградян А.Г, «Корригирующее действие пролин-богатого пептида на уровень иммуноцитокинов и пролактина в мозговой ткани при алюминиевом нейротоксикозе», 1 Междун. Конф.- Современные аспекты реабилитации в медицине. Ереван, 2003, стр. 91.
25. Ваградян А.Г, Барсегян Л.А., «Анализ модельных сдвигов некоторых нейрохимических и иммуногистохимических показателей при болезне Альцгеймера». Intern. Confer."The role of the biologically active substances in the integrative activity of the organism in normal conditions and in the process of adaptative syndrome formation", Yerevan St. Med. University. 2003, p.50-51.
26. Aghajanov M.I., Vahradyan H.G., Zilfyan A.V.and Galoyan A.A."Effect of PRP on the expression of interleukines in different organs at aluminium toxicosis", J.of Neurochemistry, v.85, Suppl.1, 2003, p.20, 34-th Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry, Newport Beach, California (May 3-7).
27. Ваградян А.Г., Галоян А.А., Агаджанов М.И., Симонян М.А., Зильфян А.В."Экспериментально-модельное исследование некоторых иммунопатологических и нейрохимических аспектов болезни Альцгеймера" ж. Проблемы старения и долголетия, 2004, т.13, №1, стр. 26-31.
28. Агаджанов М.И., Ваградян А.Г. «Анализ модельных сдвигов некоторых нейрохимических и иммуногистохимических показателей при болезни Альцгеймера". Межд. Конф. По современным подходам к диагностике, профилактике и лечению нейродегенеративных заболеваний, Новосибирск, Россия, 2003
29. Galoyan A.A., Aghajanov M.I., Vahradyan H.G. "Hypothalamic PRP protects brain neurons at aluminum neurotoxicosis". J.Neurochem. Research, USA, 2004, in press.
30. Aghajanov M.I., Vahradyan H.G., Sarkissyan J.S., Abrahamyan S.S., and Galoyan A.A. "The protective action of proline-rich polypeptide in β–amyloid induced neurodegeneration". 8th Multidisciplinary Regional CPBR-RSBP Conference of Biological Psychiatry. St-Petersburg, Russia, 17-19 May 2004. Book of Abstracts.

© National Library of Armenia

ՆԵՅՐՈՀՈՐՄՈՆԱՅԻՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ՆՈՐ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ ՆԵՅՐՈԴԵԳԵՆԵՐԱՑԻԱՅԻ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Հ.Գ.ՎԱՀՐԱԴՅԱՆ

Կատարված դիսերտացիոն հետազոտությունը գլխուղեղի նեյրոդեգեներատիվ հիվանդությունների դեպքում պրոլինով հարուստ պեպտիդ-ՊՀՊ-ի նեյրոմոդուլյատոր ազդեցության Ա.Ա. Գալոյանի ղեկավարությամբ իրականացվող ուսումնասիրությունների մասն է կազմում: Բացահայտված է, որ ՊՀՊ-ն ի թիվս ֆիզիոլոգիական և իմունոմոդուլյատոր բարձր ակտիվության այլ բազմապիսի դրսևորումների, ունի նաև Ալցհեյմերի հիվանդության դեպքում ուղեղի նեյրոդեգեներատիվ խաթարումների մոդելի ժամանակ զարգացող նեյրոքիմիական, նեյրոհորմոնալ, իմունամոդուլյատոր և մորֆոֆունկցիոնալ խաթարումների զարգացման համար պատասխանատու մի շարք հանգուցային մեթաբոլիկ օղակների վրա պաշտպանիչ գործողություն ունենալու և էապես դրանք կարգավորելու ունակություն:

Ալյումինային նեյրոտոքսիկոզի դեպքում, հաջողվել է համոզիչ կերպով ցույց տալ նեյրոդեգեներատիվ հիվանդությունների ժամանակ ատիպիկ նեյրոնալ ամիլոիդային սպիտակուցների առաջացման պրոցեսներին ուղղակի և անուղղակի ձևով առնչվող ուղեղում, հիպոկամպում և մեծկիսագնդերում ցիտոկինների (Իլ-1, Իլ-2, Իլ-6), պրոլակտինի և Աճի Ինսուլինատիպ Գործոնի (ԱԻԳ-1) վրա ՊՀՊ տարբեր կոնցենտրացիաների տարաբնույթ ազդեցությունը:

Ցույց է տրված ՊՀՊ ազդեցությունը հակաօքսիդանտային մետաղապրոտեինների վրա, ալյումինային տոքսիկոզին բնորոշ օքսիդատիվ ստրեսների ժամանակ: Ցույց է տրված ՊՀՊ նոր, անցյալում անհայտ, հատկության առկայությունը, այն է՝ հակաօքիդանտային ազդեցություն ունենալ և կարգավորել լիպիդային պերօքսիդացիայի պրոցեսների ինտենսիվությունը:

Հետազոտության էական նվաճումներից մեկը պետք է համարել գլխուղեղի նեյրոդեգեներատիվ հիվանդությունների ժամանակ տեղի ունեցող ուլտրակառուցվածքային փոփոխությունների բացահայտումը և մանրակրկիտ բնութագրումը: Հաստատված է ՊՀՊ ունակությունը կանխարգելել հիպոկամպի նեյրոնների ցիտոպլազմայիում ալյումինի մասնիկների կուտակումը և նրանց թափանցումը միջուկի թաղանթից ներս:

ՊՀՊ-ն ընդունակ է կանխել մեծկիսագնդերի կեղևի, շարժողական և լիմբիկ զոնաների նեյրոնային բջիջներում, հիպոկամպալ կոմպլեքսի նեյրոններում, հիպոթալամուսում զարգացող նեյրոդեգեներատիվ փոփոխությունները, որոնք հրահրված են β-ամիլոիդային պեպտիդի ներարկմամբ:

Այսպիսով, անցկացված հետազոտությունների արդյունքները, թույլ տվեցին որակապես հավելել գոյություն ունեցող պատկերացումները ՊՀՊ-ի բարձր կենսաբանական ակտիվության բազմաձև դրսևորումների մասին և համոզիչ կերպով ցույց տալ հետազոտվող նեյրոպեպտիդի մոտ կենտրոնական և պերիֆերիկ իմունամոդուլյատոր գործողության, ուղեղում ազատռադիկալային պրոցեսների կարգավորման ունակության, լիպիդային պերօքսիդացման մակարդակի նորմալացման և, ընդհանուր առմամբ, կանխարգելել և մեղմել գլխուղեղի նեյրոդեգեներատիվ վնասվածքները:

15.05.2014

THE NEW MECHANISMS OF NEUROHORMONAL REGULATION UNDER CONDITION OF NEURODEGENERATION

H.G. VAHRADYAN

The recent dissertation is considered to be a part of research scientific work carried out by leadership of prof. Galoyan A. in the field of studying some aspects of neuromodulatory effect of PRP, particularly during brain neurodegenerative diseases. It was revealed that a synthetic analogue of hypothalamic neurohormone, proline-rich polypeptide –PRP, along with the other multiexpressions of great physiological and immunomodulatory activities, possessed an ability to corregate and to exert protective effect on some key methabolic pathways responsible for the development of neurochemical, neurohormonal, immunomodulatory and morphofunctional impairments occuring in the models of brain neurodegenerative disorders typical for Alzheimer's disease. These data were obtained on the models of aluminum neurotoxicosis and via intracerebroventricular injection of aggregated form of beta-amyloid peptide.

At the aluminum neurotoxicosis it was obviously shown an expressed and not unidirectional effect of various concentrations of PRP at the synthesis of immunocytokines (IL-1, IL-2, IL-6), prolactine and insuline-like growth factor-1 (IGF-1), produced in situ in brain tissue, hippocamp and brain cortex directly or mediated participating in the processes of atypical neuronal amyloid protein formation during neurodegenerative diseases. It was shown the regulatory effect of PRP on the pro- and antioxidant metalloproteins of blood and tissues at oxidative stress, typical for aluminum toxicosis. It was quite obviously demonstrated an antioxidant role of PRP to regulate the intensity of lipid peroxidation processes.

One of the most significant achievements of the research work is the revealing and detailed characteristics of morphological and ultrastructural changes in the neurodegenerative disorders of the brain. It was esrablished the ability of PRP to prevent the accumulation of aluminum in the cytoplasm of hippocamp neurons and their penetration through the nuclear membrane.

Undouptfully are the data concerning the ability of PRP to prevent the development in the neurons of hippocampal complex, magnocellular nuclei of hypothalamus (SO and PV), neuronal cells of motor and limbic parts of cerebral cortex neurodegenerative changes evoked by microinjection of beta amyloid peptide (25-35). The first time in the intact animals and at the model of brain amyloid neurodegeneration neurophisiological studies have revealed the peculiarities of PRP action at the pre- and poststimular impulse current of hippocamp pyramidal neuron during single and frequent excitation of cerebral entorinal cortex. There were accepted persuasive arguments of functional character proving a developing conception concerning an existance of expressed neuroprotective action of PRP during brain neurodegenerative impairments.

Thus, the results of recent research work let us qualifically fullfill the present conception about multiform expressions of high biological activity of PRP and convincingly to demonstrate the existance of its central and periferical immunomodulating action, the ability to regulate the brain freeradical processes, the level of lipid peroxidation and as a whole to prevent and corregate the brain neurodegenertive impairments.

© National Library of Armenia

© National Library of Armenia