

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „ФИЗИОЛОГИЯ НА ЖИВОТНИТЕ И ЧОВЕКА“

ИЛИЯНА ВАСИЛЕВА САЗДОВА

**Пептидите КАРТ и обестатин като
регулатори на сърдечните
съкращения при *Rana sp.***

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ
проф. д-р ХРИСТО ГАГОВ

София 2013

ЗАЩИТАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД ЩЕ СЕ СЪСТОИ НА
ОТ.....В НА БИОЛОГИЧЕСКИЯ ФАКУЛТЕТ,
СУ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“.

*Дисертацията съдържа 129 страници, 40 фигури и 3 таблици;
цитираната литература включва 267 заглавия.*

**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „Св. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „ФИЗИОЛОГИЯ НА ЖИВОТНИТЕ И ЧОВЕКА“**

ИЛИЯНА ВАСИЛЕВА САЗДОВА

**ПЕПТИДИТЕ КАРТ И ОБЕСТАТИН КАТО РЕГУЛАТОРИ
НА СЪРДЕЧНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ ПРИ *RANA SP.***

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“**

**Научна специалност 01.06.17 „Физиология на
животните и човека“**

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ
проф.д-р ХРИСТО ГАГОВ**

София 2013

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АКАП – белтък, закотвящ протеинкиназа А (A-kinase anchor proteins)

АКТХ – адренкортикотропен хормон

АЦ – аденилатциклаза

ГАМК – γ -аминомаслена киселина

ДАГ – диацилглицерол

ДМСО – диметил сулфоксид

ЕТА – ендотелин А

ЕТВ – ендотелин В

ИТФ – инозитолтрифосфат

КАРТ – кокаин- и амфетамин-регулируем транскрипт

КРФ-И – инхибитор на кортикотропин-освобождаващия фактор

МАПК – митоген-активируема протеинкиназа

ПТ – пертусис токсин

ПКА-И – инхибитор на протеинкиназа А

ФИЗК – фосфоинозитид-3-киназа

АМРА – α -амино-3-хидроксил-5-метил-4-изоксазол пропионат

АР1 – активиращ белтък 1

АР2 – активиращ белтък 2

СаМК II – Са/калмодулин зависима протеинкиназа II

CRE – cAMP response elements (цАМФ-свързващ елемент)

ERK – extracellular signal-regulated kinases (киназа, регулируема от извънклетъчни сигнали)

GPCR – G-protein-coupled receptor (G-протеин-свързан рецептор)

KCNQ – delayed rectifier potassium channels

MEK1/2 - mitogen-activated protein kinase kinase type 1 and 2

NCDC – 2-nitro-4-carboxyphenyl N,N-diphenylcarbamate

NCX – Sodium-Calcium exchanger (натриево-калциев обменник)

NMDA – N-метил-D-аспартат

REM – rapid eye movement

SP1 – човешки транскрипционен фактор с мотив тип „цинкови пръсти”

STAT – сигнален трансдюсер и активатор на транскрипцията

TRPC - transient receptor potential cation (channels)

УВОД

Връзката между кокаин- и амфетамин-регулируем транскрипт (КАРТ) и злоупотребата с лекарства предизвиква значителен научен интерес по отношение на физиологичните функции на този пептид. Освен това, локомоторните ефекти на КАРТ, както и ефектът на различни наркотици върху експресията на КАРТ-пептида в хипоталамуса, насочва изследванията към проучване на участието му в нарушенията, свързани с употребата на наркотици.

Не по-малко интересна е ролята на КАРТ в стресовите реакции. Литературните данни показват връзка между плазменото ниво на КАРТ и това на кортизола. Необходими са обаче много по-подробни изследвания за установяване механизма на действие и функционалната значимост на тази вариация в плазменото ниво на КАРТ.

Физиологичната важност на КАРТ е установена, но рецепторът за него предстои да бъде открит. Малко е известно и за клетъчните сигнални пътища, по които КАРТ осъществява своите ефекти. Установено е, че КАРТ активира $G_{i/o}$ -белтък в някои клетъчни линии, което силно подкрепя тезата, че съществува специфичен G-протеин-свързан рецептор (G-protein-coupled receptor, GPCR) за КАРТ. От друга страна група учени показват, че КАРТ може да потенциира инсулиновата секреция с участието на цАМФ и протеинкиназа А, което предполага съществуването на един или повече рецептори за КАРТ, куплирани с различни G-белтъци.

Данните за обестатина са още по-оскъдни, а и в много случаи са и доста противоречиви. Рецепторът за този пептид все още не е еднозначно доказан. Въпреки краткия му полуживот, е доказано, че обестатинът повлиява редица процеси в организма. Наличието му в майчиното мляко поставя въпроса за ролята му в растежа и развитието на новородените. Предполага се, че обестатинът има свойства на хормон, тъй като проявява ефекти върху секрецията на инсулин от β -клетките на панкреаса и лутеинизирането на клетките в яйчниците. Отношението на обестатина към процесите на запаметяване и обучение и към фазите на съня, въпреки че не преминава кръвно-мозъчната бариера, поставя сериозно предизвикателство пред учените за изясняване на механизма, по който влияе.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да установят ефектите на пептидите КАРТ и обестатин върху сърдечната

дейност на жаба *Rana sp.* и механизмите, по които те се реализират.

За постигането на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Да се проследи влиянието на КАРТ върху сърдечната дейност на жаба в присъствие на адренорецепторни блокери.

2. Да се определи ефектът на КАРТ върху сърдечната дейност на жаба след разрушаване на ЦНС, след екстирпация на хипофизата и след функционално елиминиране на интерреналните жлези.

3. Да се определи влиянието на КАРТ върху сърдечната дейност на жаба след третиране с инхибитори на вълтреклетъчни сигнални вериги.

4. Да се изследва влиянието на обестатина върху сърдечната дейност на жаба в присъствие на адренорецепторни блокери.

5. Да се установи участието на вълтреклетъчния сигнален път АЦ→цАМФ→протеинкиназа А в ефекта на обестатина върху сърдечната дейност на жаба.

6. Да се изследва отношението на сигналната верига фосфолипаза С → ИТФ+ДАГ → протеинкиназа С към влиянието на обестатина върху силата на сърдечните съкращения на жаба.

Поради възникнали в хода на изследването непредвидени трудности с фармакологичните агенти, разтворени в широко използвания органичен разтворител диметил сулфоксид (ДМСО) и за пълното изясняване на механизма на действие на изследвания от нас пептид обестатин, бяха поставени и някои допълнителни задачи:

7. Да се проследи собствения ефект на 0,1% ДМСО, както и влиянието на обестатина в присъствието на същия, върху сърдечната дейност на жаба.

8. Да се тества влиянието на 0,1% ДМСО върху инотропния му ефект в присъствие на блокери на α_1 - и β -адренорецептори.

9. Да се изследва връзката между сигналната верига фосфолипаза С → ИТФ+ДАГ → протеинкиназа С и влиянието на 0,1% ДМСО върху силата на сърдечните съкращения на жаба.

10. Да се проследи участието на TRPC (transient receptor potential cation)-каналите и натриево-калциевия обменник (NCX) в реализирането на собствените ефекти на 0,1% ДМСО върху сърдечната дейност на жаба.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Опитна постановка

В началото на всеки експеримент жабите бяха инжектирани с етилкарбамат (уретан) 5% разтвор – 0.05ml/g телесна маса за въвеждане в анестезия. При *in vivo* опити наркозата беше поддържана с етилетер, напоен в памук и поставен в устната кухина на жабата или чрез втриване в кожата. След приключване на изследването животните бяха умъртвявани чрез разрушаване на главния и гръбначния мозък с препаративна игла. При *in vitro* опитите след инжекционното наркотизиране жабите бяха декапитирани и денервирани, след което беше изолирано сърцето.

In vivo експерименти

In vivo опитите бяха провеждани с КАРТ, тъй като на препарат „изолирано сърце“ пептидът не показва ефект върху силата на сърдечните съкращения. При тези експериментални условия след като бяха упоявани, жабите бяха фиксирани по гръб и се правеше триъгълен разрез на гръдния им кош. Сърцето се почистваше добре от перикарда, включително и лигамента между върха на сърцето и венозния синус, след което се свързваше към тензодатчик. След края на всеки опит жабите бяха претегляни, за да може да се пресметне крайната ефективна концентрация на въвежданите вещества, която достига до клетките. При проследяване ефекта на КАРТ на денервирани жаби ЦНС беше разрушавана още в началото на експеримента.

Екстирпация на хипофиза и функционално елиминиране на интерреналните жлези на жаба

Екстирпацията на хипофиза се правеше на наркотизирани жаби, които се фиксираха по гръб в парафинирана ваничка, като предните крайници бяха изтегляни силно встрани, горната челюст – нагоре, а долната челюст беше опъвана силно назад, при

което устата се отваряше широко. Правеше се разрез на лигавицата на небцето точно по средната линия и малко зад дъната на очните орбити. Откриваше се парасфеноидалната кост и с остра ножица се правеше триъгълен отвор в нейната основа. Изрязвано беше костно капаче и внимателно беше отчупвано с пинсета. Така се откриваше хипофизата, която внимателно се отстраняваше с очна пинсета.

Анатомията на жабата не позволява оперативно отстраняване на надбъбречните жлези, тъй като те са плътно фиксирани към бъбреците. Затова бе приложено тяхното функционално елиминиране. След анестезирането на жабата и отварянето на коремната кухина двете ренални артерии бяха лигирани и интерреналните жлези бяха изключени от общото кръвообращение.

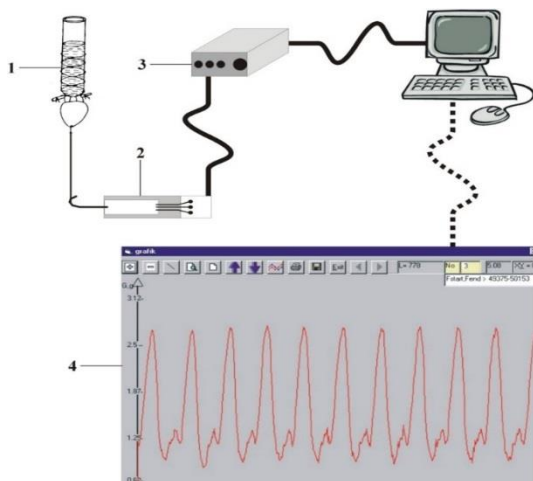
In vitro експеримент

Обестатинът, за разлика от КАРТ, проявяваше ефекта си на препарат „изолирано сърце“ и с цел по-точната локализация на изследвания механизъм и по-коректна интерпретация на получените данни бяха проведени предимно опити *in vitro* с този пептид. При този експериментален модел след упояване и денервиране жабите бяха фиксирани по гръб в парафинирана ваничка. Сърцето беше откривано и перикардът беше почистван, включително и в основата на големите кръвоносни съдове. Сърцето беше перфузирано с около 2 ml Рингеров разтвор с цел да се отстрани кръвта от аортата, за да се избегне запушване на канюлата от образуван съсирек. Три лигатури бяха поставяни и затягани в следната последователност: първата – под аортния конус се издърпваше максимално надолу така, че част от венозния синус да остане към препарата, втората – на десния клон на аортата и третата – на левия клон на аортата. Затягането на първата лигатура преустановяваше навлизането на кръв в сърцето и с последващите няколко сърдечни удара до затягането на втората лигатура се изпомпваше останалата в сърцето кръв след промиването. Правеше се кос напречен разрез на около $\frac{1}{2}$ от диаметъра на левия клон на аортата. В този отвор беше вкарван върхът на канюлата, която предварително се запълваше с

Рингеров разтвор, преминаваше се през аортния конус и по време на систола, когато аортната клапа е отворена, канюлата се вкарваше в камерата. Третата лигатура се затягаше около канюлата и аортното разклонение над разширението на канюлата. Изрязвани бяха всички съдове и тъкани зад поставените лигатури и канюлата беше фиксирана на статив във вертикално положение. Върхът на сърцето се захващаше със серфин и се свързваше към тензодатчик. Той предаваше информация за съкращението чрез аналогово-цифров преобразувател към компютър.

Регистриране на сърдечната дейност

За настоящите изследвания фирма Стокс, София, България разработи специализирана софтуерна програма TENZSU. Тя позволява регистриране на сърдечната дейност и съхранение на получените данни в електронен вариант (фиг. 1).



Фигура 1 *Опитна постановка за регистриране на сърдечните съкращения на жаба TENZSU: 1 – канюла с изолирано сърце; 2 – тензодатчик; 3 – аналогово-цифров преобразувател; 4 – оригинален запис. По абсцисата е представено времето, а по ордината – силата на сърдечните съкращения.*

За допълнителната визуализация на получените данни беше разработена спомагателна програма TENZOGRAPH. За превръщането на данните в табличен вид, подходящ за обработка, използвахме специално разработен софтуер – Hearts_M5. Той позволяваше да се определи с точност силата на сърдечните съкращения в даден момент от експеримента.

Представяне на получените резултати и статистическа обработка на данните

Регистриращата система усилва получения сигнал 3 пъти. След това действителната сила на сърдечните съкращения беше изчислявана след трикратно редуциране на регистрираната амплитуда и беше изразена в милиньютони (mN). Получените стойности показваха абсолютната стойност на силата на сърдечните съкращения в момента на изследване. Осредняването на стойностите за силата на сърдечните съкращения във всяка експериментална група и сравняването между отделните групи по абсолютни стойности беше невъзможно, поради индивидуалните характеристики на използваните животни. Ето защо, силата на сърдечните съкращения беше представена като % от силата, измерена в определен момент от началото на експеримента, приета за 100% – за КАРТ на 60^{-ата} минута от началото на експеримента, а за обестатина – на 10^{-ата} минута. Използвани бяха стойности след адаптиране на препаратите, когато силата на сърдечните съкращения е сравнително постоянна. При *in vivo* опитите периодът на адаптация беше много по-продължителен поради многократните увреждащи процедури на инжектиране на вещества във венозния синус. При *in vitro* условия грубата интервенция от изолирането на сърцето беше еднократна и ефектът от нея бързо отшумяваше.

Опитите бяха провеждани на стайна температура (18-22 °C). Всички вещества бяха разтваряни в 200 µl Рингеров разтвор или разтвор, съдържащ ДМСО, и бяха инжектирани във венозния синус (при *in vivo* опитите) или въвеждани в канюлата (при *in vitro* опитите). При контролните опити препаратите бяха третирани с чист Рингеров разтвор или Рингеров разтвор с ДМСО на интервали, съответстващи на въвеждането на останалите

вещества в продължение на 105 min (за КАРТ) или на 90 min (за обестатин).

Допълнителни контроли бяха направени след екстирпирането на хипофизата и с функционално елиминирани интерренални жлези с цел да се отдиференцират ефектите на изследвания пептид от тези на съответната манипулация.

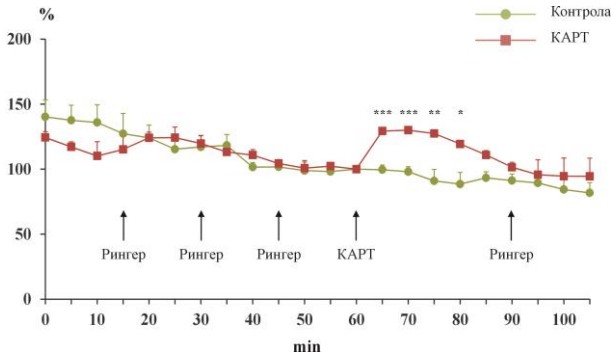
Всички данни са представени като средни стойности \pm стандартна грешка. Броят на опитите в текста е представен с *n* за всяка експериментална група. Статистическата достоверност беше определяна чрез Стюдънт *t*-тест за независими проби. За статистически достоверни бяха приети данни с $P < 0.05$.

Съставът на Рингеровия разтвор е както следва: NaCl 100 mM, KCl 1,3 mM, CaCl₂ 0,68 mM и NaHCO₃ 1,19 mM.

IV. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ РЕЗУЛТАТИ

Ефект на КАРТ върху сърдечната дейност на жаба

В проведените експерименти беше използван човешки КАРТ пептиден фрагмент 55-102 в концентрация 18 ng/g телесна маса, добавени в 200 μ l Рингеров разтвор. Средната телесна маса на използваните жаби беше 58 g, а теглото на кръвта на жабата е 4,6% от телесното ѝ тегло. Плазмата представлява 59% от кръвта, което предполага концентрация от около 30 nM КАРТ в кръвната плазма, ако се приеме, че цялото количество КАРТ попада в кръвта. Като се отчете и приблизително 10-кратното разреждане при преминаването на КАРТ от кръвната плазма в извънклетъчната течност, крайната концентрация, достигаща до сърдечните мускулни клетки е 3 nM. Тази концентрация на КАРТ е около 2 пъти по-висока от нормалната за кръвта, перфузираща хипоталамуса и хипофизата и около 10 пъти по-висока от тази в системното кръвообращение. Ефектът на КАРТ е показан на фиг 2.

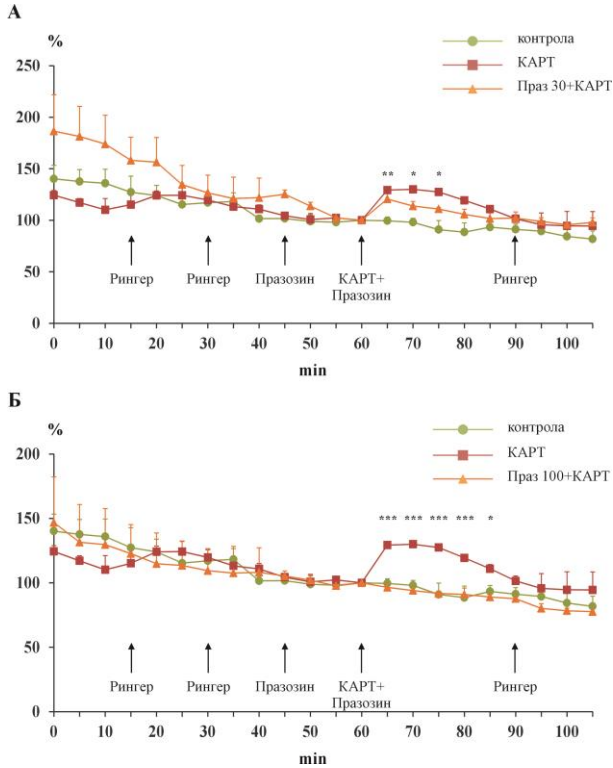


Фигура 2. Ефект на КАРТ върху силата на съкращения на жабешко сърце: (●) – контролна сила на сърдечните съкращения в Рингеров разтвор; (■) – сърдечна дейност в присъствие на КАРТ. Данните са представени като средни стойности \pm стандартната грешка ($n=6$). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ и * $P < 0.05$ спрямо съответните амплитуди в контролни условия.

При тези условия КАРТ предизвикваше положителен инотропен ефект, който е статистически достоверен в продължение на 20 min след инжектирането му. След това сърцето възстановяваше контролната си сила на съкращение (последните 4 точки от графиката на фиг. 2 (■)).

Влияние на КАРТ върху сърдечната дейност на жаба в присъствие на адренорецепторни блокери

Положителен инотропен ефект върху сърдечната дейност с най-голяма вероятност би се реализирал чрез адреналин, отделен от симпатиковите влакна, инервиращи сърцето или чрез освобождаване на катехоламини от надбъбречните жлези. Ето защо, с цел разкриване механизма на действие на КАРТ бяха използвани два блокера на адренергичните рецептори. Празозинът като специфичен блокер на α_1 -адренорецепторите беше инжектиран във венозния синус 15 min преди въвеждането на КАРТ в концентрация 30 $\mu\text{mol/l}$ в 200 μl Рингеров разтвор (фиг. 3).



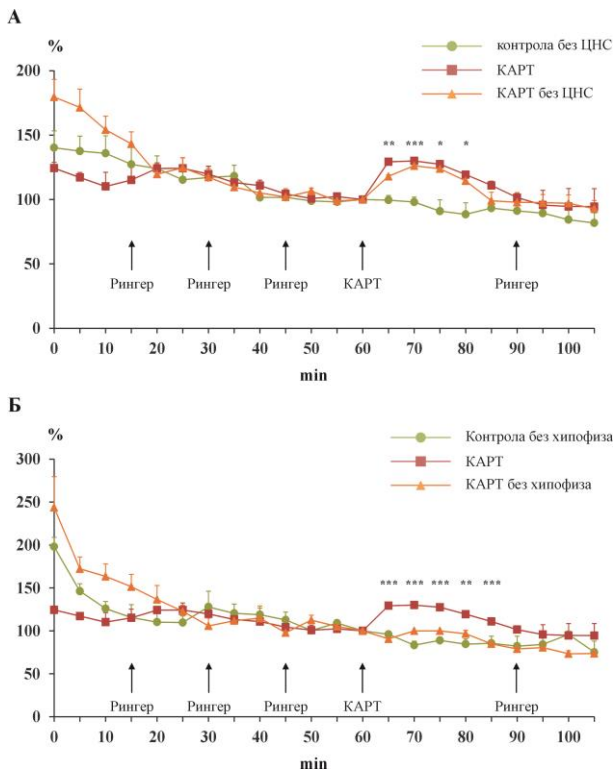
Фигура 3. Ефект на КАРТ върху амплитудата на сърдечните съкращения на жаба в присъствие на празозин: (●) - контролна сила на сърдечните съкращения в Рингеров разтвор; (■) – сърдечна дейност в присъствие на КАРТ; (▲А) – ефект на КАРТ в присъствие на празозин 30 $\mu\text{mol/l}$; (▲Б) – ефект на КАРТ в присъствие на празозин 100 $\mu\text{mol/l}$. Съответните концентрации на празозин са означени като Праз 30 (А) и Праз 100 (Б). Данните за ефекта на КАРТ в присъствие на празозин са представени като средни стойности \pm стандартната грешка ($n=6$). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ и * $P < 0.05$ спрямо контролната амплитуда в присъствие на Рингерово разтвор (А) и спрямо ефекта на КАРТ (Б).

Ефектът на КАРТ беше понижен от празозина до 16% (на $10^{-\text{ата}}$ min от въвеждането на КАРТ), но оставаше статистически достоверен спрямо контролата (фиг. 3А). При третирането с висока концентрация от 100 $\mu\text{mol/l}$ празозинът напълно премахваше ефекта на пептида (фиг. 3Б). Ето защо предположихме, че ефектът на КАРТ върху сърдечната дейност се реализираше чрез адреналин, отделен като невромедиатор или хормон, с участието на α_1 -адренорецепторите.

Влияние на КАРТ върху сърдечната дейност на жаба след разрушаване на ЦНС, екстирпация на хипофизата или третиране с антагонист на рецептора за кортикотропин-освобождаващия хормон

С цел да се определи дали източник на адреналин, участващ в положителния инотропен ефект на КАРТ, са симпатиковите нервни влакна или надбъбречните жлези бяха направени изследвания на жаби с разрушена ЦНС. Участието на невромодулятор в реализирането на ефектите на КАРТ върху изолирано жабешко сърце не беше изследвано, тъй като този пептид не показва никакъв ефект на сърдечни препарати. По-вероятно е участието на ендокринни жлези в реализиране ефекта на КАРТ. За да се провери тази хипотеза, беше отстранена хирургично хипофизата. Екстирпацията на хипофизата почти напълно елиминира ефекта на КАРТ върху жабешкото сърце, доказвайки участието на хипофизни хормони в проявата на положителния инотропен ефект на КАРТ.

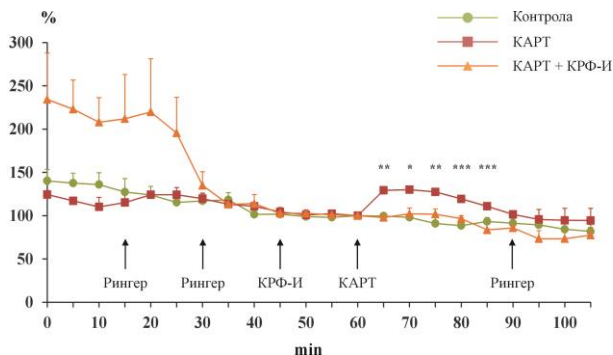
При контролните животни хипофизектомията водеше до по-силно понижаване на началната сила на сърдечните съкращения от $198 \pm 10,9\%$ до $110 \pm 7,7\%$, общо с 88% през първите 30 min след операцията при контролните опитни животни с екстирпирана хипофиза (фиг. 4Б, (●)).



Фигура 4. Ефект на КАРТ върху силата на сърдечните съкращения на жаба след механично разрушаване на ЦНС или след екстирпация на хипофизната жлеза: А: (●) – сила на сърдечните съкращения след разрушаване на ЦНС; (■) – сърдечна дейност в присъствие на КАРТ; (▲) – ефект на КАРТ след разрушаване на ЦНС; Б: (●) – сила на сърдечните съкращения след екстирпация на хипофизата; (■) – сърдечна дейност в присъствие на КАРТ; (▲) – ефект на КАРТ след екстирпация на хипофизата. Данните са представени като средни стойности ± стандартната грешка (n=6). * P < 0.001, ** P < 0.01 и * P < 0,05 спрямо силата на сърдечните съкращения след разрушаване на ЦНС (А) и след екстирпация на хипофизата (Б).**

За да се докаже еднозначно участието на хипофизата в този процес, беше използван и високо специфичен антагонист на

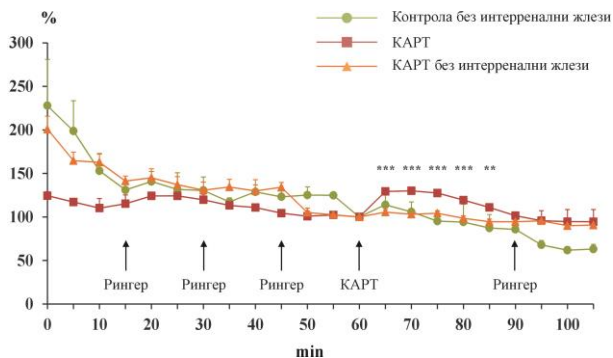
рецептор тип 2 за кортикотропин-освобождаващия хормон – антисаувагин-30. Той беше въведен в концентрация 10 $\mu\text{mol/l}$ 15 min преди третирането с КАРТ (фиг. 5). Антисаувагин 30 сам по себе си практически не променяше силата на сърдечните съкращения, както се вижда от фиг. 5 в интервала 45^a – 60^a min (▲). Инхибиторът напълно премахва положителния инотропен ефект на КАРТ при същите експериментални условия.



Фигура 5. Ефект на КАРТ върху амплитудата на сърдечните съкращения на жаба след третиране с инхибитор на кортикотропин-освобождаващия хормон (КРФ-II): – (●) – контролна сила на сърдечните съкращения в Рингеров разтвор; (■) – сърдечна дейност в присъствие на КАРТ; (▲) – ефект на КАРТ в присъствие на антисаувагин-30. Данните са представени като средни стойности \pm стандартната грешка ($n=5$). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ и * $P < 0,05$ спрямо КАРТ.

Влияние на КАРТ върху сърдечната дейност на жаба след функционално елиминирание на интерреналните жлези и третиране с инхибитор на 11- β -хидроксилазата

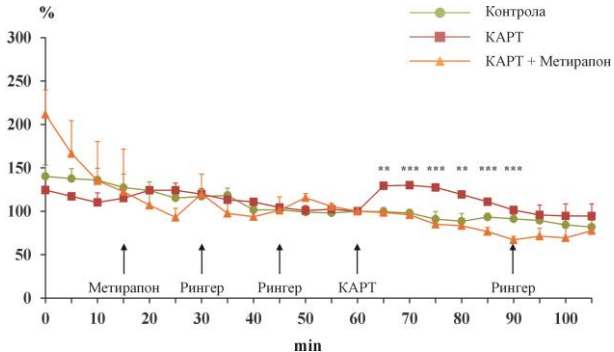
Хипофизата не секретира хормони, подобни на адреналина. Вероятно тя е междинно звено между рецепторите за КАРТ и α_1 -адренорецепторите. Предвид горепосочените резултати за участието на кортикотропин-освобождаващия хормон в ефектите на КАРТ, нашите изследвания бяха насочени към установяване ролята на надбъбречните жлези в наблюдавания ефект (фиг. 6).



Фигура 6. Ефект на КАРТ върху амплитудата на сърдечните съкращения на жаба след функционално елиминирание на интерреналните жлези: (●) – сила на сърдечните съкращения след лигиране на интерреналните жлези; (■) – сърдечна дейност в присъствие на КАРТ; (▲) – ефект на КАРТ след лигиране на интерреналните жлези. Данните са представени като средни стойности \pm стандартната грешка ($n=6$). *** $P < 0.001$ и ** $P < 0.01$ спрямо КАРТ.

При горепосочените експериментални условия положителният инотропен ефект на КАРТ не се наблюдаваше, което позволява да се предположи, че крайното звено на хормоналната ос, активирана от КАРТ са именно надбъбречните жлези.

За допълнително потвърждение на участието на надбъбречите жлези в положителния инотропен ефект на КАРТ беше използван инхибитор на $11\text{-}\beta$ -хидроксилазата – метирапон. Той блокира синтеза на кортизол в надбъбречните жлези в концентрация $4,5 \mu\text{mol/l}$ (фиг. 7).



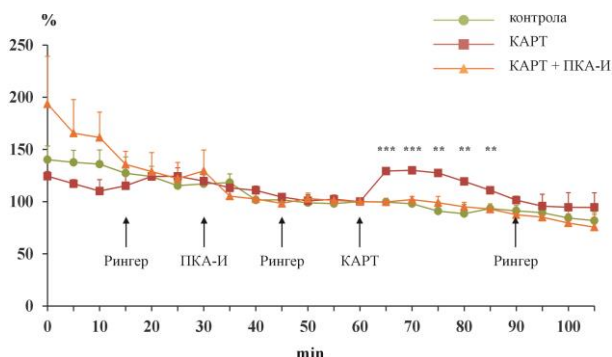
Фигура 7. Ефект на КАРТ върху амплитудата на съкращение на жабешко сърце след третиране с метирапон: (●) – контролна сила на сърдечните съкращения в Рингеров разтвор; (■) – сърдечна дейност в присъствие на КАРТ; (▲) – ефект на КАРТ в присъствие на метирапон. Данните за ефекта на КАРТ в присъствието на метирапон са представени като средни стойности \pm стандартната грешка ($n=6$). *** $P < 0.001$ и ** $P < 0.01$ спрямо КАРТ.

Метирапонът, както при предходно използваните инхибитори не показваше собствени ефекти върху сърдечната дейност. В присъствие на метирапон КАРТ не повлияваше помпените функции на жабешко сърце, което показваше участието на кортикостероидните хормони от надбъбречните жлези в реализирането на положителния инотропен ефект на пептида.

Влияние на КАРТ върху сърдечната дейност на жаба в присъствие на инхибитори на ПКА и $G_{i/o}$ -белтъци

С цел проследяването на втреклетъчната сигнална верига, участваща в положителния инотропен ефект на КАРТ след активирането на α_1 -адренергичните рецептори беше въведен Rp-sAMPS – специфичен инхибитор на активацията на ПКА I и II от цАМФ. Той е аналог на цАМФ, преминава през мембраната и не се разгражда от фосфодиестерази за циклични нуклеотиди.

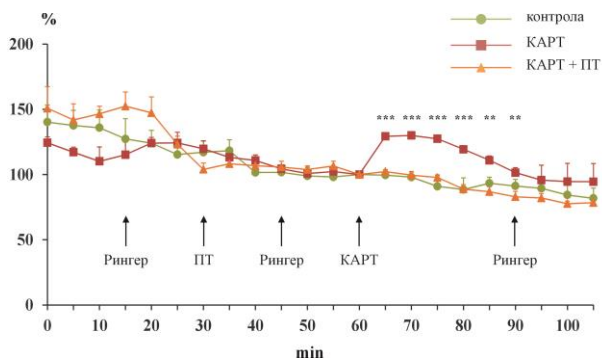
Rp-cAMPS беше инжектиран в концентрация 1 mmol/l 30 min преди КАРТ, за да има достатъчно време да премине през клетъчната мембрана и да навлезе в цитоплазмата (фиг. 8).



Фигура 8. Ефект на КАРТ върху силата на съкращенията на жабешко сърце след третиране с инхибитор на протеинкиназа А: (●) – контролна сила на сърдечните съкращения в Рингеров разтвор; (■) – сърдечна дейност в присъствие на КАРТ; (▲) – ефект на КАРТ в присъствие на Rp-cAMPS (PKA-II). Данните са представени като средни стойности ± стандартната грешка (n=5). *** P < 0.001 и ** P < 0.01 спрямо КАРТ.

Ефектът на КАРТ напълно беше потиснат от инхибитора на протеинкиназа А. Rp-cAMPS сам по себе си не променяше силата на сърдечните съкращения в интервала между 30-ата и 60-ата min, което е показано на фиг. 8 (▲).

Изследвано беше също участието на ПТ-чувствителни G-белтъци в сигналния път на КАРТ. Инжектирането на ПТ 30 ng/g телесна маса като необратим инхибитор на $G_{i/o}$ -белтъците 30 min преди третирането с КАРТ не повлияваше силата и честотата на сърдечните съкращения. Последващото въвеждане на КАРТ в присъствието на ПТ не предизвикваше положителен инотропен ефект, което доказва участието на ПТ-чувствителни $G_{i/o}$ -белтъци в сигналния път, задействан от КАРТ (фиг. 9). И двата използвани инхибитора (Rp-cAMPS и ПТ) не повлияваха способността на сърцето да възстановява контролната си сила на съкращение след третирането с КАРТ.



Фигура 9. Ефект на КАРТ върху амплитудата на сърдечните съкращения на жаба след третиране с пертусис токсин (ПТ): (●) – контролна сила на сърдечните съкращения в Рингеров разтвор; (■) – сърдечна дейност в присъствие на КАРТ; (▲) – ефект на КАРТ в присъствие на ПТ. Данните са представени като средни стойности \pm стандартната грешка ($n=6$). *** $P < 0.001$ и ** $P < 0.01$ спрямо КАРТ.

Обестатин

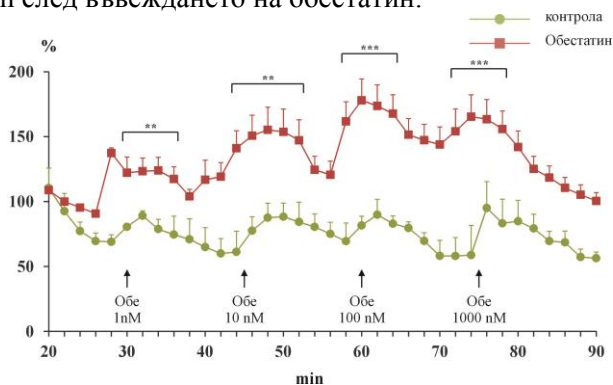
Ефект на обестатин върху препарат „изолирано сърце“ на жаба

Въведени бяха нарастващи концентрации на обестатин – 1, 10, 100 и 1000 pmol/l през интервал от 15 min, като обестатинът показваше нарастващ статистически достоверен положителен инотропен ефект върху изолирано жабешко сърце при изследваните концентрации (фиг. 10).

По литературни данни ефектът на обестатин върху апетита показва U-образна крива. Ефектите му се проявяват в интервал от 10 до 100 pmol/kg обестатин, докато дози от 0,01 до 3 и над 1 – 3 $\mu\text{mol/kg}$, въведени интраперитонеално нямат ефект (Lagaud et.al. 2007).

Положителният инотропен ефект, предизвикан от обестатина беше краткотраен 8 – 10 min. Най-ниската използвана концентрация (1 pmol/l) повишаваше амплитудата на сърдечните съкращения с $19 \pm 4,7\%$ ($n=6$) 2 min след въвеждането му, с

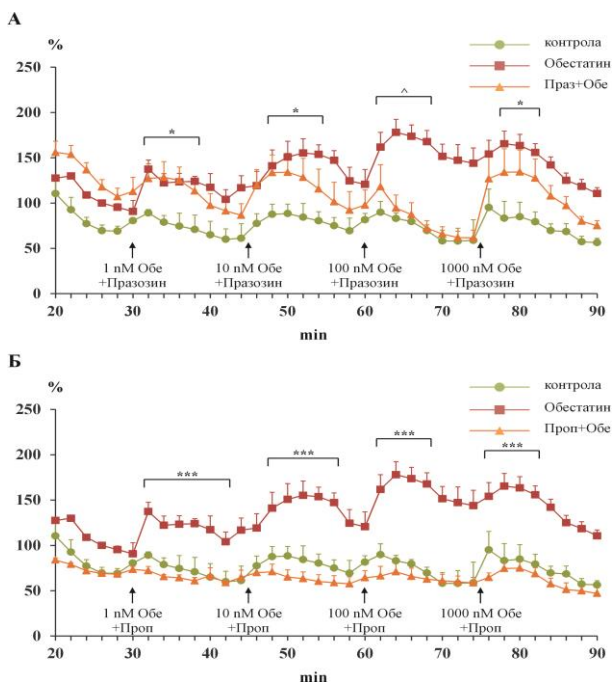
22,3±6,1% 4 min след въвеждането, с 23,4±5,1% 6 min след третирането и с 24±5,1% 8 min след третирането. При концентрация от 10 nmol/l повишението беше с 19±10,8% 2 min след въвеждането на обестатина, с 41,2±13,4% 4 min след третирането, с 50,8±15,8% 6 min след въвеждането и с 55,3±17,5% 8 min след третирането. При следващите по-високи концентрации (100 и 1000 nmol/l) положителният инотропен ефект на обестатина достигаше максимална стойност още на 4^{-а} min след въвеждането и по-бързо намаляваше в сравнение с двете по-ниски концентрации. Две минути след третирането със 100 nmol/l обестатин повишението беше с 61,8±15,1%, на 4^{-ата} min – 78±16,5%, на 6^{-ата} min – 73,7±16,3%, а на 8^{-ата} min – 67,8±14,5%. Въвеждането на 1000 nmol/l променяше амплитудата на сърдечните съкращения съответно с 54,1±17,2% на 2^{-ата} min, с 65,5±16,8% на 4^{-ата} min, с 63,5±15,2% на 6^{-ата} min и с 55,9±13,9% на 8^{-ата} min след въвеждането на обестатин.



Фигура 10. Ефект на обестатина върху амплитудата на сърдечните съкращения на препарат „изолирано сърце“: – (●) – амплитуда на сърдечните съкращения при контролни условия в Рингеров разтвор; (■) – ефект на обестатин. Данните са представени като средни стойности ± стандартната грешка (n=6). *** P < 0.001; ** P < 0.01 спрямо контролата.

Влияние на обестатина върху препарат „изолирано сърце“ на жаба в присъствие на адренорецепторни блокери

Положителният инотропен ефект на обестатин, както и при КАРТ, насочи вниманието ни към изследване участието на адренергичните рецептори в наблюдавания ефект (фиг. 11).



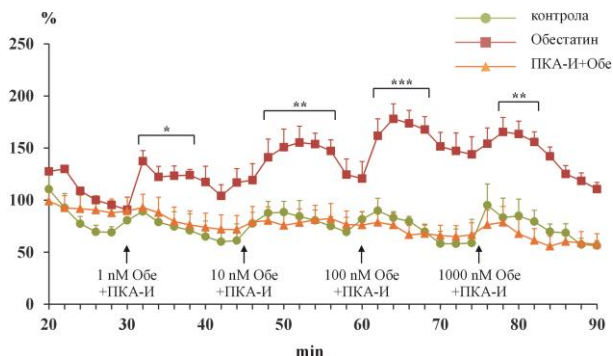
Фигура 11 Ефект на обестатин върху силата на сърдечните съкращения на жаба в присъствие на блокери на адренергичните рецептори празозин и пропранолол: (●) – амплитуда на сърдечните съкращения при контролни условия в Рингеров разтвор; (■) – ефект на обестатин; (▲А) – ефект на обестатин в присъствие на празозин (Праз). * $P < 0.05$ спрямо контролните съкращения; ^ $P < 0.05$ спрямо обестатин. Б: (▲Б) – ефект на обестатин в присъствие на пропранолол (Проп). *** $P < 0.001$ спрямо обестатин. Данните са представени като средни стойности \pm стандартната грешка ($n=6$).

Празозинът беше въведен в канюлата заедно с Рингеров разтвор (в общ обем от 200 μ l) 15 min преди третирането с обестатин (фиг. 11А). В присъствие на блокера обестатинът в концентрации 1, 10 и 1000 nmol/l показваше по-слаб и по-бързо затихващ, но все още статистически достоверен положителен инотропен ефект. Обестатинът в концентрация 100 nmol/l не показваше статистически значим ефект върху силата на сърдечните съкращения спрямо контролната амплитуда, докато при останалите три концентрации амплитудата оставаше близка по стойност до тази при самостоятелния ефект на пептида.

Изследвано беше и участието на β -адренорецепторите в наблюдавания ефект на обестатина. Препаратите бяха предварително третирани с 30 μ mol/l пропранолол 15 min преди въвеждането на обестатин (фиг. 11Б). Пропранололът в тази концентрация премахваше ефекта на обестатин върху силата на сърдечните съкращения за всички използвани концентрации на обестатин. Освен това пиковете в следствие апликирането на разтвора, наблюдавани при всички останали експериментални групи, бяха значително редуцирани.

Влияние на обестатина върху препарат „изолирано сърце“ на жаба след третиране с инхибитор на ПКА

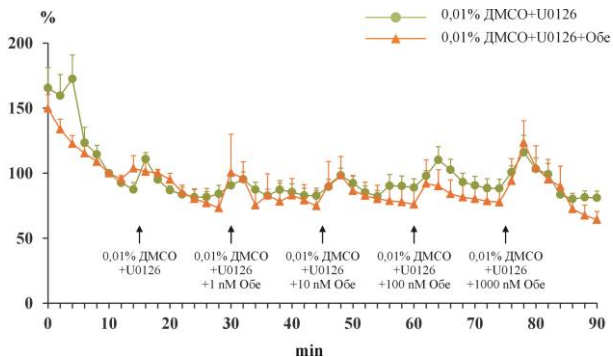
Участието на вътреклетъчната сигнална верига АЦ \rightarrow цАМФ \rightarrow протеинкиназа А в положителния инотропен ефект на обестатина беше изследвано с помощта на Rp-cAMPS, селективен инхибитор на протеинкиназата. Той беше въведен в концентрация 30 μ mol/l. Ефектът на обестатина беше напълно премахнат при прилагането на Rp-cAMPS и практически силата на сърдечните съкращения не се различаваше от контролната (фиг. 12). Положителният инотропен ефект на обестатин не се наблюдаваше при всички използвани концентрации на хормона.



Фигура 12. Ефект на обестатин (Обе) върху амплитудата на сърдечните съкращения на жаба в присъствие на Rp-sAMPS (ПКА-И): (●) – амплитуда на сърдечните съкращения при контролни условия в Рингеров разтвор; (■) – ефект на обестатин; (▲) – ефект на обестатин в присъствие на ПКА-И. * $P < 0.001$, ** $P < 0,01$ и * $P < 0.05$ спрямо групата с обестатин. Данните са представени като средни стойности \pm стандартната грешка ($n=6$).**

Влияние на обестатина в присъствие на 0,01% ДМСО върху препарат „изолирано сърце“ на жаба след третиране с инхибитор на митоген-активируемата протеинкиназа киназа тип 1 и 2 (МЕК1/2)

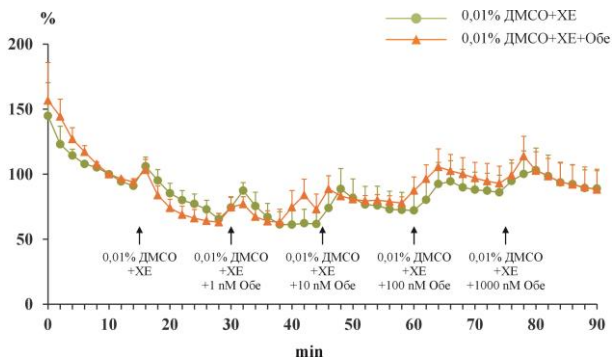
Участието на митоген-активируемия протеинкиназен (МАПК) път в механизма на действие на обестатина също беше изследван. За целта използвахме U0126 (3 $\mu\text{mol/l}$), високо селективен инхибитор на MEK1 и MEK2 (фиг. 13). Той беше въвеждан в присъствие на 0,01% ДМСО. Обестатинът не проявяваше положителен инотропен ефект в присъствие на U0126 при всички използвани концентрации на пептида.



Фигура 13. Ефект на обестатин върху амплитудата на сърдечните съкращения на жаба в присъствие на 0,01% ДМСО и U0126: (●) – амплитуда на сърдечните съкращения на изолирано жабешко сърце в присъствие на 0,01% ДМСО и U0126; (▲) – ефект на обестатин в присъствие на 0,01% ДМСО и U0126. Данните са представени като средни стойности \pm стандартната грешка ($n=6$).

Влияние на обестатина в присъствие на 0,01% ДМСО върху препарат „изолирано сърце“ на жаба след третиране с инхибитор на KCNQ йонни канали

Изследвано беше участието на потенциал-зависимите калиеви канали тип KCNQ (Kv7, M-тип) в ефекта на обестатина върху препарат „изолирано сърце“ на жаба. За целта беше използвана селективна концентрация на XE991 (10 $\mu\text{mol/l}$) (фиг. 14). Ефектът на обестатина в присъствие на инхибитора беше напълно блокиран при всички използвани негови концентрации, което показва съществената роля на KCNQ-каналите в реализирането на това влияние. Още повече, че литературните данни показват освен отношението им към възбудимостта на сърцевите клетки и взаимно повлияване между тях и L-тип калциевите канали.



Фигура 14. Ефект на обестатин върху амплитудата на сърдечните съкращения на жаба в присъствие на 0,01% ДМСО и ХЕ991 (ХЕ): (●) - амплитуда на сърдечните съкращения на изолирано жабешко сърце в присъствие на 0,01% ДМСО и ХЕ; (▲) - ефект на обестатин в присъствие на ХЕ. Данните са представени като средни стойности ± стандартната грешка (n=6).

V. ОБСЪЖДАНЕ

КАРТ

Препарати *in vivo* на жабешки сърца са използвани широко в науката за изследване на преки или косвени ефекти на различни биологично активни вещества върху сърцевата мускулатура. Този надежден експериментален модел беше използван и от нас в изследванията ни върху механизма на действие на КАРТ върху сърдечната дейност на жаба. КАРТ се експресира в множество нервни центрове и периферни тъкани, включително и тези, активиращи се при стрес – хипоталамус, хипофиза, надбъбречни жлези. Освен това, експресията му значително се повишава след третиране с кокаин и амфетамини, което допълнително повишава научния интерес към този пептид и механизмите му на действие.

Наблюдаваният от нас положителен инотропен ефект при този обект би могъл да е директно предизвикан чрез стимулиране на сърцевите мускулни клетки или непряко чрез повлияване на нервната или хормоналната сигнализация към сърцето. Третирането на животните със специфичен блокатор на α_1 -адренорецепторите показва

участието на катехоламини в КАРТ-индуцираната регулация на сърдечната дейност. Вероятен източник на катехоламини са симпатиковите нервни окончания и интерреналната жлеза – най-важният регулатор на сърдечната дейност при земноводните и функционален аналог на надбъбречната жлеза при бозайниците. Хипотезата, че КАРТ може да действа директно на миокарда не може да бъде отхвърлена напълно, въпреки липсата на специфични инхибитори на рецептора за КАРТ. Нашите данни сочат, че еферентната сигнализация от ЦНС няма отношение към положителния инотропен ефект на КАРТ в *in vivo* условия. В настоящите изследвания функционалното елиминиране на интерреналните жлези обаче ефективно премахва положителния инотропен ефект на КАРТ в *in vivo* условия. Важно е да се отбележи, че единственият катехоламин при жабите, произвеждан от интерреналната жлеза, е адреналина, който за разлика от този при бозайници, се свързва с висок афинитет към α_1 -адренорецептори (Lazou 2002).

Основен регулаторен път за интерреналните жлези е оста хипоталамус-хипофиза. Ето защо, хипофизата беше екстирпирана, което също водеше до изключване на положителния инотропен ефект на КАРТ. Този резултат предполага участието на хипофизен хормон или хормони в КАРТ-индуцираното сигнализиране в *in vivo* условия. Повечето хормони на хипофизата са тропни – оказват влияние върху други ендокринни жлези. За малко от тях се знае, че осъществяват директен ефект върху неендокринни клетки. Нито един от тях не е известен като ендегенен стимулатор на сърдечната дейност. Ето защо, може да се обобщи, че при жаби КАРТ осъществява положителен инотропен ефект като активира оста хипоталамус-хипофиза-интерренални жлези, както се случва и при бозайниците (Baranowska et.al. 2006).

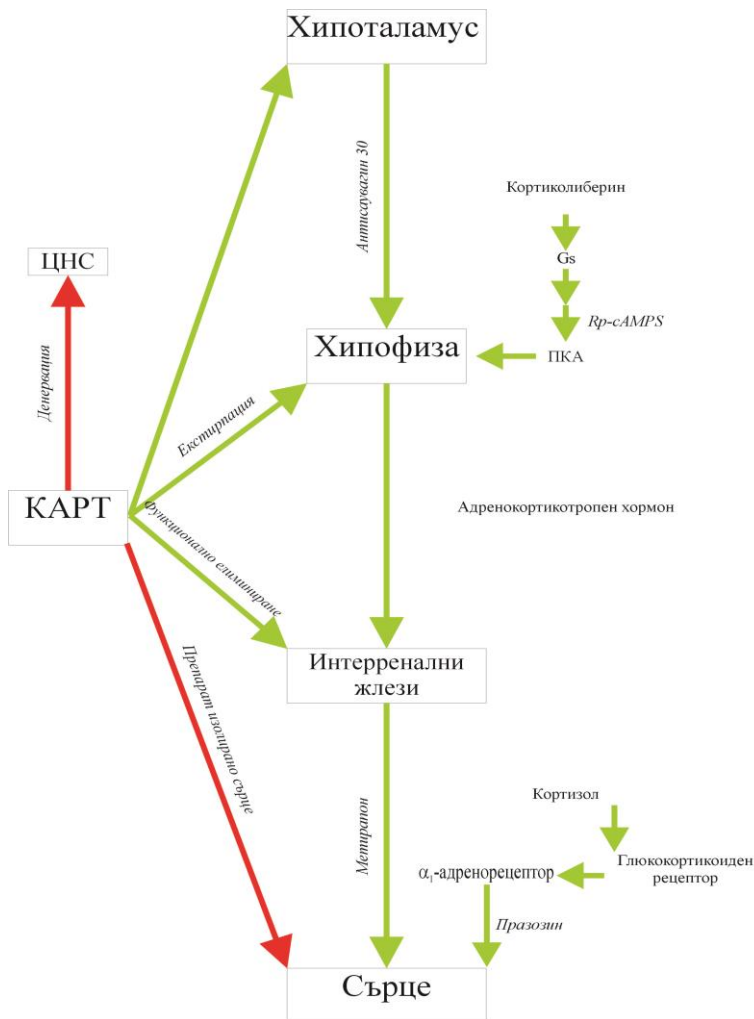
Нашите данни доказват, че КАРТ може да повлиява сърдечната дейност *in vivo* като активира оста хипоталамус-хипофиза-интерренални жлези. Така експресията на КАРТ-чувствителна молекула в хипоталамуса и/или хипофизата на жаба трябва да се вземе под внимание (рецептор за КАРТ все още не е идентифициран). Хипотезата за участието на хипоталамуса и хипофизата в стимулирането на сърдечната дейност от КАРТ е подкрепена от

пълното инхибиране на положителния инотропен ефект с антисаувагин 30, специфичен антагонист на рецептор тип 2 за кортикотропин-освобождаващия хормон. Метирапонът, инхибитор на 11- β -хидроксилазата, блокира синтеза на кортизол в надбъбречната жлеза (Fornhem et.al. 1995) и напълно инхибира положителния инотропен ефект на КАРТ. Този резултат показва участието на повишената кортикостероидна синтеза в механизма на активиране на α_1 -адренорецепторите от КАРТ и отхвърля възможността за директно повишаване на плазмените нива на адреналина при жабата.

Активираната от цАМФ протеинкиназа А също участва в реализирането на ефекта на КАРТ върху сърдечната дейност на жаба. В присъствието на инхибитор на протеинкиназа А въвеждането на КАРТ не предизвиква физиологичен ефект, което предполага съществена роля на протеинкиназа А в една или повече стъпки от сигналния път на КАРТ. Най-вероятно такава стъпка е активирането на хипофизните рецептори за кортикотропин-освобождаващия хормон, чиято сигнална верига включва активирането на G_s -белтък и на аденилатциклаза (Liaw et.al. 1996, Grammatopoulos et.al. 2000). Друга такава стъпка, зависима от цАМФ, е взаимодействието на КАРТ с КАРТ-свързваща молекула в клетъчната мембрана, последвано от активирането на G_s -белтък (Wierup et.al. 2006). Възможна е и понижена сигнализация на ниво интерренални жлези.

В нашето изследване, влиянието на КАРТ върху сърдечната дейност беше потиснато при предварително третиране с ПТ, което показва участието на $G_{i/o}$ -белтък в сигналния път на КАРТ (Kaslow & Burns 1992). Това позволява да се предположи съществуването на рецептор за КАРТ, куплиран с $G_{i/o}$ -белтък в хипоталамус и/или хипофиза на жаба. Както и другите рецептори, свързани с G -белтък, той също може да е куплиран с повече от един G -белтък (Hermans 2003, Wettschureck & Offermanns 2005). Това предположение, обаче, не може да бъде проверено все още в *in vivo* условия, тъй като липсват специфични инхибитори за всички познати G -белтъци.

На фиг. 15 схематично е представен предполагаемият сигнален път, задействан от КАРТ при реализирането на положителния му инотропен ефект върху сърдечната дейност на жаба.



Фигура 15. Механизъм на действие на KART: \rightarrow Участие в механизма на действие на KART; \rightarrow Без отношение към положителния инотропен ефект на пептида. До всяка стрелка са посочени съответните процедури, блокери или инхибитори, използвани за да се докаже сигналната верига на KART при *in vivo* условия.

Обестатин

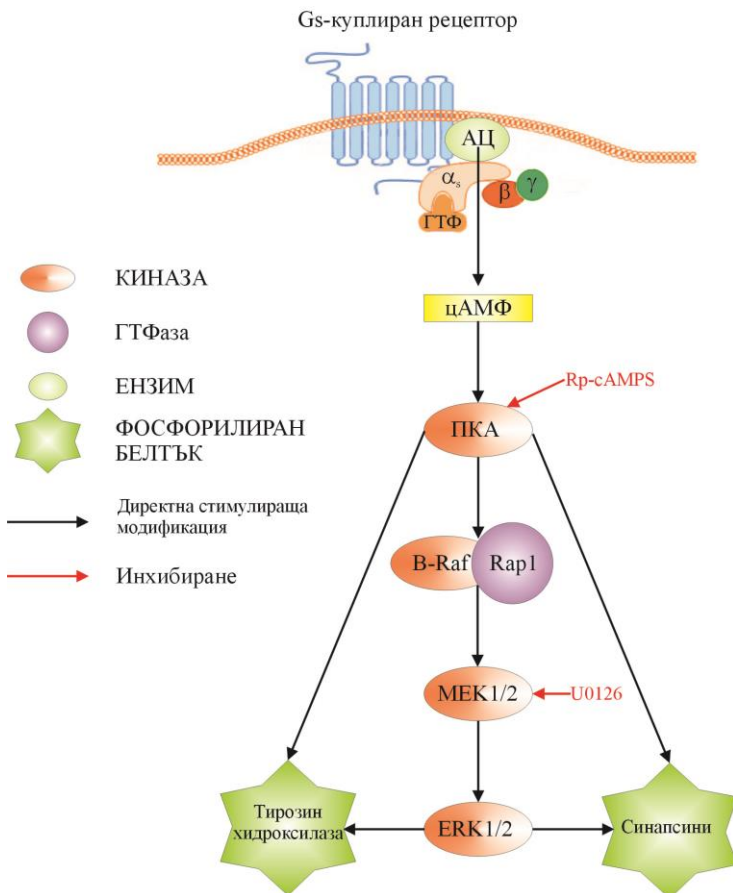
Получените от нас резултати показват, че обестатинът има силен положителен инотропен ефект (фиг. 10), който се реализира чрез активиране на адренергичните рецептори. Вътреклетъчната сигнализация през сърдечните β -адренорецептори е добре проучено в детайли (Lohse et.al. 2003). Доминиращият сигнален път включва активиране на протеинкиназа А, която фосфорилира няколко важни за сърдечните съкращения белтъци като L-тип калциеви канали (Gerhardstein et.al. 1999), рианодинови рецептори (Marx et.al. 2000), фосфоламбан (Simmerman & Jones 1998), тропонин I (Sulakhe & Vo 1995) и др. При жабешкото сърце липсват вътреклетъчни депа за калций с функционална значимост (Klitzner & Morad 1983) и следователно фосфорилирането на рианодиновия рецептор и фосфоламбана не би било от физиологично значение. Инхибирането на NCX от протеинкиназа А обаче е от съществено значение за вътреклетъчната концентрация на калций в сърдечните мускулни клетки при земноводните (Fan et.al. 1996). NCX в жабешкото сърце работи в обратен режим като механизъм за внасяне на калций в клетката. Активирането на β -адренорецепторите води до повишаване на входа през потенциал-зависими (бързи) калциеви канали в началото на деполяризацията, а след това на по-късен етап от потенциала на действие потиска бавния внос на калций през обменника. Превключването между бързия и бавния калциев ток при адренергична стимулация позволява бързото генериране на мускулна сила в началото на акционния потенциал и ускорява отпускането – механизъм, заместващ функциите на комплекса саркоплазматична Са-АТФаза/фосфоламбан при бозайниците (Fan et.al. 1996). Тези литературни данни предполагат, че NCX не е определящ фактор в наблюдавания положителен инотропен на обестатина.

Получените резултати ни дават основание да смятаме, че обестатинът активира в симпатикови нервни окончания веригата Gs-куплиран рецептор \rightarrow цАМФ \rightarrow протеинкиназа А \rightarrow MEK1/2 \rightarrow ERK1/2 \rightarrow фосфорилиране на синапсини и тирозин хидроксилаза. По отделно α - и $\beta\gamma$ -субединиците стимулират различни ефектори, включващи ензими и йонни канали. По този

начин се регулират множество сигнални пътища, един от които е МАПК-пътят (Johnson & Dhanasekaran 1989, Hepler & Gilman 1992, Dhanasekaran et.al. 1995). МАПК-пътят от своя страна контролира критични сигнални вериги като клетъчна пролиферация и диференциация и апоптоза (Fanger et.al. 1997, Dhanasekaran & Premkumar Reddy 1998, Chang & Karin 2001). Всеки от МАП-киназните модули се състои от най-малко три различни кинази, които се отбелязват като МАПККК→МАПКК→МАПК. Последната фосфорилира различни ефектори като транскрипционни фактори, ензими и други белтъци, повлиявайки техните функции (Chang & Karin 2001). Един от тези модули е Raf (МАПККК)→МЕК1/2 (МАПКК)→ЕРК1/2 (МАПК) (Landis 1989, Lyons et.al. 1990), за чието активиране са необходими функциониращи $G\alpha_s$ -субединица и протеинкиназа А (Wan & Huang 1998). Прицелните белтъци за ЕРК1/2 са редица транскрипционни фактори, синапсините и тирозин хидроксилазата (Giachello et.al. 2010). Транскрипционните фактори, за разлика от синапсините и тирозин хидроксилазата, не биха могли да участват в бързо наблюдавания се ефект на обестатина, тъй като изискват време за синтеза на нови белтъчни молекули.

В съответствие с горепосочените литературни данни, получените от нас резултати показват, че обестатинът активира неизвестен за момента рецептор, куплиран към Gs-белтък, който активира сигнален път протеинкиназа А-Raf-МЕК1/2-ЕРК1/2. Фосфорилирането на синапсините от ЕРК1/2 води до освобождаването на адреналин от симпатиковите нервни окончания на сърцето и до наблюдавания положителен инотропен ефект на обестатина. Освобождаването на медиатор може да се подсили и от допълнителното фосфорилиране на синапсините директно от протеинкиназа А. Използваните инхибитори на протеинкиназа А (Rp-cAMPS, фиг. 12) и МЕК1/2 (U0126, фиг. 13) напълно премахват ефекта на обестатина.

Предполагаемият сигнален път на обестатина в симпатиковите нервни окончания на сърцето е представен обобщено на фиг. 16.



Фигура 16. Механизъм на действие на обестатина в симпатикови неврони: С червени стрелки са посочени съответните инхибитори, използвани, за да се докаже сигналната верига на обестатина при освобождаването на адреналин. АЦ – аденилатциклаза; ГТФ – гуанозинтрифосфат; PKA – протеинкиназа А; MEK1/2 – mitogen-activated protein kinase kinase type 1 and 2; ERK1/2 – extracellular signal-regulated kinases (киназа, регулируема от извънклетъчни сигнали).

Ако ефектът на обестатина се дължи само на освобождаването на вече складираня в синаптозомите адреналин от симпатиковите нервни окончания в използвания от нас препарат на изолирано жабешко сърце, то ефектът му би отслабвал към края на експеримента. Получените от нас данни обаче показват, че пептидът има най-силен ефект при последните две изследвани концентрации. Това се подsigурява от активирането на тирозин хидроксилазата, както от протеинкиназа А, така и от ERK1/2 и синтезата на нови молекули медиатор.

Освободеният адреналин от симпатиковите нервни окончания осъществява мощен контрол върху сърдечната дейност като повишава честотата и силата на сърдечните съкращения. Както беше посочено и в литературния обзор, хронотропният ефект се реализира чрез промяна на пропускливостта на пейсмейкърните клетки на синусовия възел, а инотропният – чрез пряк ефект върху работния миокард на камерата. При използвания от нас препарат на изолирано сърце обестатинът беше въвеждан директно в камерата като се избягваше влиянието върху възбудно-проводната система на сърцето. Ето защо, след прилагането на обестатина и последващото освобождаване на адреналин беше наблюдаван само инотропният ефект.

Активирането на β -адренорецепторите води до активиране на Gs-белтък \rightarrow протеинкиназа А-сигналния път и фосфорилиране на L-тип калциеви канали и KCNQ1 канали (Hille 2001). Стимулирането на β_1 -адренергичните рецептори, които активират само Gs белтъци, води до дифузно повишаване на нивото на цАМФ. Докато β_2 рецепторите се куплират както с Gs, така и с $G_{i/o}$ и предизвикват по-локализирано активиране на L-тип калциевите канали (Chen-Izu et.al. 2000). Литературните данни сочат, че протеинкиназа А фосфорилира α_1 - и β_{2a} - субединиците на калциевия канал като за α_1 се изисква близостта на А-киназа закотвящ белтък (АКАП), а за β_{2a} – не изисква такъв белтък (Gao et.al. 1997). Предвид особеностите на жабешкото сърце входящият ток на калциеви йони от извънклетъчната среда е съществен за реализирането на сърцевото съкращение и силата

му е пропорционална на навлезлия отвън калций (Niedergerke 1963). Ето защо, инхибирането на β -адренорецепторите и на протеинкиназа А напълно премахваше положителния инотропен ефект на обестатина. Необходимо е активиране и на $G_{i/o}$ -белтъците, за да се насочи фосфорилирането от протеинкиназа А към калциевите канали. Такова превключване е характерно за β_2 -адренорецепторите и се реализира чрез фосфорилиране на рецептора от протеинкиназа А при наномоларни концентрации на стимулация и от киназа, фосфорилираща вътреклетъчния домен на GPCR при насищащи концентрации на активиране на рецептора (Hausdorff et.al. 1990, Iyer et.al. 2006). Инхибирането на ПТ-чувствителните $G_{i/o}$ -белтъци също премахваше положителния инотропен ефект на обестатина чрез делокализация на сигнала от протеинкиназа А към Ca^{2+} канали.

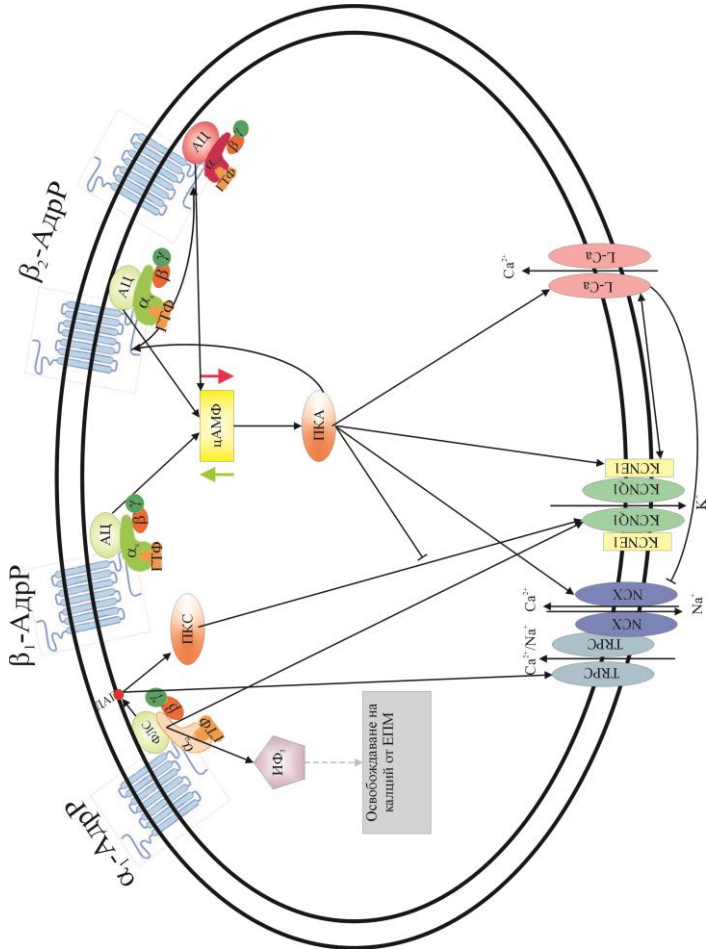
Другият тип йонни канали, потенциално фосфорилирани от протеинкиназа А, и имащи отношение към положителния инотропен ефект на адреналина са KCNQ (Kv7) каналите. Открити са 5 подтипа на KCNQ-каналите – KCNQ1-5. Те се формират като хомо- или хетеротетрамери с различна тъканна локализация и функции. KCNQ1 са характерни за сърдечни мускулни клетки, където контролират продължителността на реполяризацията в потенциала на действие на тези клетки (Sanguinetti et.al. 1996). Останалите подтипове (KCNQ2-5) са характерни за невроните (Wang et.al. 1998). По-късно са установени и в други тъкани – KCNQ2/3 са характерни за горния цервикален ганглий (Wang et.al. 1998), KCNQ5 са открити в периферни ганглии (Passmore et.al. 2003) и съдови гладкомускулни клетки (Mackie et.al. 2008), а KCNQ4 хомотетрамери доминират във вътрешното ухо и слуховата зона на мозъчната кора (Kubisch et.al. 1999). За разлика от останалите подтипове калиеви канали, KCNQ1 не формира хетеротетрамери с останалите подтипове, а само хомотетрамери. Активността на канала се регулира от две допълнителни субединици KCNE1 (Chen et.al. 2003). Протеинкиназа А фосфорилира KCNE1-субединицата чрез активиране на ПТ-чувствителни $G_{i/o}$ -белтъци (Washizuka et.al. 1997). Киназата формира комплекс с KCNQ-

каналите и АКАП-белтъка *Yotiao* и фосфорилира Ser27 в N-края на канала в рамките на комплекса, който е необходим за повлияване активността на канала (Kurokawa et.al. 2004). KCNQ1-KCNE1-комплексът може да бъде фосфорилиран и от протеинкиназа С, но само ако преди това не е активиран от протеинкиназа А (Lo & Numann 1998). В съответствие с литературните данни нашите резултати показват участието на описаната сигнална верига в механизма на действие на адреналин-медиацията ефект на обестатина. Пропранололът (фиг. 11Б), ПТ в Рингеров разтвор, Rp-cAMPS (фиг. 12) и ХЕ991 (фиг. 14) блокират статистически достоверно ефекта на обестатина в целия диапазон на използваните концентрации. GF109203X като инхибитор на протеинкиназа С от своя страна не го повлиява.

Проверена беше и възможността обестатинът да повлиява KCNQ-каналите в нервните окончания. Литературните данни подсказват ключова роля на тези канали в освобождаването на норадреналин от симпатиковите нервни окончания на горния цервикален ганглий, които инервират сърцето (Hernandez et.al. 2008). ХЕ991 от своя страна инхибира с еднаква ефективност всички подтипове на KCNQ-каналите. Src тирозин киназата фосфорилира и съответно потиска тока през KCNQ3, KCNQ4 и KCNQ5 хомотетрамерите, както и KCNQ2/3 хетеротетрамерите. Тя обаче не повлиява KCNQ1 (Gamper et.al. 2003), тъй като местата за фосфорилиране (Tyr67 и Tyr349) не присъстват в този подтип (Li et.al. 2004). Получените от нас данни показват, че Src тирозин киназата не участва в наблюдавания положителен инотропен ефект на обестатина. В присъствие на PP2 (инхибитор на Src) пептидът повишава силата на сърдечните съкращения, особено силно при концентрации от 10 и 100 nM/l. По този начин се доказва, че се повлияват сърцевите KCNQ-канални след активиране на сигнални вериги от адреналина, а не невроналните, които модулират освобождаването на невромедиатора от симпатиковите нервни окончания. Освен че KCNQ1 и L-тип калциевите канали по отделно се активират от адренергичната стимулация, има данни и че калциевите канали може да усилят

тока през KCNQ каналите в корови пирамидни неврони. Това взаимно повлияване на двата типа канали зависи от активността и на протеинкиназа А (Wu et.al. 2008).

Предполагаемият механизъм на действие на адреналина, освободен под влияние на обестатина, върху сърцевите мускулни клетки е представен схематично на фиг. 17. В обобщение, обестатинът повлиява неидентифициран Gs-куплиран рецептор в симпатиковите окончания чрез протеинкиназа А и ERK1/2-зависимо фосфорилиране на синапсините и тирозин хидроксилазата. Това води до отделянето на готови молекули адреналин и синтезата на нови такива. Наблюдаваните ефекти на екзоцитирания адреналин върху сърдечната дейност са типични и обестатин-независими. Хронотропните влияния на адреналиновата сигнализация са лимитирани от изолирането на сърцето, тъй като всички химични и фармакологични агенти са въвеждани директно в камерата без да могат да повлияят възбудно-проводната система. В обобщение, обестатинът повлиява неидентифициран Gs-куплиран рецептор в симпатиковите окончания чрез протеинкиназа А и ERK1/2-зависимо фосфорилиране на синапсините и тирозин хидроксилазата. Това води до отделянето на готови молекули адреналин и синтезата на нови такива. Наблюдаваните ефекти на екзоцитирания адреналин върху сърдечната дейност са типични и обестатин-независими. Хронотропните влияния на адреналиновата сигнализация са лимитирани от изолирането на сърцето, тъй като всички химични и фармакологични агенти са въвеждани директно в камерата без да могат да повлияят възбудно-проводната система.



Фигура 17. Механизъм на действие на обестатина върху сърцевите мускулни клетки: \rightarrow – активиране; \rightarrow – потискане. АдрР – адренорецептор; АЦ – аденилатциклаза; ГТФ – гуанозин трифосфат; ЕПМ – ендоплазмена мрежа; ИФ₃ – инозитол трифосфат; PKA – протеинкиназа A; PKC – протеинкиназа C; KCNQ – delayed rectifier potassium channels; L-Ca – L-tip calcium channels; NCX – Sodium-Calcium exchanger (натриево-калциев обменник); TRPC – transient receptor potential cation (channels).

VI. ИЗВОДИ

1. Въвеждането на КАРТ в жаби *in vivo* повишава силата на сърдечните съкращения.

2. Този ефект на КАРТ се осъществява чрез активиране на оста хипоталамус-хипофиза-интерренални жлези по механизъм, зависещ от кортикотропин-освобождаващия хормон.

3. КАРТ повлиява помпените функции на сърцето като активира α_1 -адренорецепторите на кардиомиоцитите по кортикостероид-зависим механизъм.

4. Продължително гладуване премахва положителния инотропен ефект на КАРТ, което предполага участието на ендогенния КАРТ във физиологичната адаптация на сърдечно-съдовата система към енергийната обмяна при изследваните студенокръвни организми .

5. Третирането с обестатин на изолирани жабешки сърца в опити *in vitro* повишава значително и дозозависимо силата на сърдечните съкращения.

6. Обестатинът, чрез Gs-куплирани рецептори на симпатикови нервни окончания, активира вътреклетъчната сигнална верига АЦ→протеинкиназа А→ERK1/2. ERK1/2 тип MAP киназа повишава както отделянето, така и синтеза на адреналин.

7. В присъствие на празозин положителният инотропен ефект на обестатина частично намалява, а пропранололът напълно го премахва.

8. Ефектът на адреналина е комплексен като се повлияват L-тип калциеви канали, KCNQ1-канали и Na^+ - Ca^{2+} обменен механизъм, които от своя страна взаимно модулират проводимостта си.

VII. ПРИНОСИ

1. Установен бе регулаторният път на действие на КАРТ при *in vivo* условия върху сърдечната дейност на жаба. Сигналната верига включва последователното отделяне на кортикотропин-освобождаващ хормон от хипоталамуса, секреция на АКГХ от хипофизата и на кортизол от интерреналните жлези. Последният потенциира активирането на сърдечните α_1 -адренергични рецептори.

2. При изследването с КАРТ бе установено, че продължително гладуване на жабите, което за тези студенокръвни животни не действа като стресов фактор и следователно не включва стресовата ос хипоталамус-хипофиза-интерренални жлези, се губи чувствителността към КАРТ. Еднократно нахранване до дни възстановява тази сигнализация, което установихме от възстановения ефект на КАРТ върху сърдечната дейност.

3. Доказано бе освобождаването на невромедиатор от окончанията на вегетативните неврони при препарат „изолирано сърце“ от жаба в присъствие на обестатин. Установено бе, че обестатинът стимулира както освобождаване на адреналин, така и неговия синтез *de novo* в симпатиковите нервни окончания. Тези процеси се дължат на МЕК-зависимо активиране на ERK1/2 тип МАП-киназа, която действа чрез синапсина и тирозин хидроксилазата. Така индуцираната от обестатина адренергична медиация води предимно до ефекти, обусловени от β -адренергичните рецептори на сърцевите мускулни клетки.

4. Установено бе, че прилагането на обестатин в присъствие на стандартно прилаганата ниска доза от 0.1% от широко използваният липофилен разтворител ДМСО предизвиква аномални ефекти, дължащи се на неспецифичното собствено действие на ДМСО. Поради това ДМСО, където бе възможно, се прилагаше в много по-ниската крайна концентрация от 0.01% или бе заменян от метанол.

5. За реализиране на настоящия дисертационен труд бяха разработени три специализирани програмни продукта – TENZSU, TENZOGRAPH и Hearts_M5. Прецизирани бяха някои процедурни стъпки при *in vivo* експериментите като интервалът и броят на убожданията във венозния синус, начинът на въвеждане в анестезия без повлияване на сърдечната дейност и без модификации на записа, и функционалното елиминирание на интерреналните жлези чрез лигиране на реналните артерии.

Списък на публикации, включени в дисертационния труд

1. **Ийана В. Иванова**, Rudolf Schubert, Dessislava B. Duridanova, Thomas B. Bolton, Lubomir T. Lubomirov & Hristo S. Gagov, Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide as an in vivo regulator of cardiac function in *Rana ridibunda* frog, *Exp Physiol*, 2007, 92: 1037-1046. IF 3,014

2. **Sazdova, I.V.**, Ilieva, B.M., Minkov, I.B., Schubert, R. & Gagov, H.S. 2009, "Obestatin as contractile mediator of excised frog heart", *Cent. Eur. J. Biol.*, 4(3), 327-334. IF 0.915

3. **Ийана В. Sazdova**, B.M. Ilieva, M. Shkodrova, A. Milusheva, M. Chichova, R. Schubert, F. Fülöp, L. Lubomirov, H. Gagov, Obestatin Signalling in frog heart, *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 2013, 66(8). (под печат)

Участия в конференции и научни форуми по темата на дисертацията

1. **Ийана Sazdova**, B. Ilieva, I. Minkov, H. Gagov, Effects of DMSO and regulatory peptide derived from preproghrelin on the frog heart *in vitro* preparations, XI Anniversary Scientific conference with international attendance, 27-29 May 2009, Sofia, p157

2. **Sazdova I.**, B. Ilieva, M. Shkodrova, H. Gagov, Mechanism of positive inotropic effect of DMSO in the frog heart, X National congress of Bulgarian society for physiological sciences, 06-09 October 2011, Varna, p234

Установени цитирания

1. **Sazdova, I.V.**, Ilieva, B.M., Minkov, I.B., Schubert, R. & Gagov, H.S. 2009, "Obestatin as contractile mediator of excised frog heart", *Cent. Eur. J. Biol.*, 4(3), 327-334. IF 0.915

1. Seim, I, Walpole, C, Amorim, L, Josh, P, Herington, A, & Chopin, L (2011). The expanding roles of the ghrelin-gene derived peptide obestatin in health and disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 340(1), 111-117. Retrieved from www.scopus.com

2. Agnew, AJ, Robinson, E, McVicar, CM, Harvey, AP, Ali, IHA, Lindsay, JE, Grieve, DJ (2012). The gastrointestinal peptide obestatin induces vascular relaxation via specific activation of endothelium-dependent NO signalling. *British Journal of Pharmacology*, 166(1), 327-338. Retrieved from www.scopus.com

Изказвам най-искрени благодарности на научния си ръководител проф. Христо Гагов за компетентната помощ и търпение при изготвянето на настоящия дисертационен труд.

Безкрайно съм признателна на целия колектив на катедра „Физиология на животните и човека“ за приятелското отношение и благоприятната творческа среда. Специално благодаря на гл.ас. Мариела Чичова за ценните съвети и на ас. Биляна Илиева за подкрепата и помощта при експерименталната работа.

Благодаря на приятелите ми, които не изгубиха вяра в мен, когато аз сама не си вярвах.

Не бих могла да се отблагодаря на съпруга ми за търпението и безпрекословната подкрепа през всичките години.