



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ
ФАРМАЦЕВТИЧЕН ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „ХИМИЯ И БИОХИМИЯ”

Красимир Огнянов Боянов

**ВЛИЯНИЕ НА МОДУЛАТОРИ С ДОКАЗАН
АНТИКОАГУЛАНТЕН ЕФЕКТ ВЪРХУ ГЛИКОЛИЗАТА И
ПРОЦЕСИ НА ФОСФОРИЛИРАНЕ В ЧОВЕШКИ
ТРОМБОЦИТИ**

Автореферат

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР”

Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика”
Професионално направление 4.3. „Биологически науки”
Научна специалност „Медицинска биохимия”

Научен ръководител:
проф. Ана Манева, дбн, дб

Пловдив, 2017 г.

Дисертационният труд е написан на 113 страници, съдържа 16 фигури и 7 таблици. Цитирани са 336 литературни източника.

Част от изследванията са реализирани при изпълнение на проект СДП-02/2015, финансиран от Медицински Университет – Пловдив, получил съответното разрешение от Комисия по Научна етика към Медицински Университет – Пловдив с протокол №5/29.10.2015 за работа с човешки биологичен материал.

Дисертационният труд е обсъден от разширен катедрен съвет на катедра „Химия и биохимия“ към Фармацевтичен факултет на Медицински университет – Пловдив, състоял се на 10.04.2017 г. и насрочен за официална защита пред научно жури в състав:

Проф. Ана Иванова Манева, дбн, дб
Проф. Татяна Иванова Влайкова, дб
Проф. Илия Николов Илиев, дб
Проф. Румен Димитров Младенов, дб
Доц. Атанас Димов Арнаудов, двм

Резервни членове:

Доц. Тонка Атанасова Василева, дб
Доц. д-р Таня Иванова Денева, дм

Защитата на дисертационния труд ще се състои на2017 г. отч. в Аудиторен комплекс –аудитория, на Медицински университет – Пловдив.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на МУ-Пловдив и са публикувани на интернет страницата на МУ-Пловдив.

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения и символи.....	4
1. Въведение.....	5
2. Цел и задачи.....	7
3. Материали и методи.....	8
4. Резултати и обсъждане.....	11
4.1. Ефект на лактоферина, вортманина, кофеина, кверцетина, амилорида и оуабаина върху гликолизата в човешки тромбоцити, определено по количеството на образувания лактат.....	11
4.1.1. Ефект на лактоферина върху гликолизата в тромбоцити.....	11
4.1.2. Ефект на вортманина, кофеина, кверцетина, амилорида и оуабаина върху гликолизата в тромбоцити	13
4.1.3. Интерференция на модулатори на фосфорилирането и йонния транспорт с лактоферина върху регулация на гликолизата.....	16
4.2. Ефект на лактоферина, вортманина, кофеина, кверцетина, амилорида и оуабаина върху степента на фосфорилиране на Сер-16 в Na ⁺ - K ⁺ -АТФаза, Тре-197 в РКА и Тир-467/199 във РІЗК.....	17
4.2.1. Ефект на лактоферина, вортманина, кофеина, кверцетина и оуабаина върху степента на фосфорилиране на Сер-16 в Na ⁺ - K ⁺ -АТФаза.....	17
4.2.2. Ефект на лактоферина, вортманина, кофеина, кверцетина и амилорида върху степента на фосфорилиране на Тре-197 в РКА.....	22
4.2.3. Ефект на лактоферина, вортманина, кофеина, кверцетина, оуабаина и амилорида върху степента на фосфорилиране на Тир-467/199 във РІЗК.....	27
4.3. Ефект на лактоферина, вортманина, кверцетина, оуабаина и амилорида върху количеството на цАМФ в човешки тромбоцити.....	32
4.4. Заключение.....	37
5. Изводи.....	38
6. Приноси.....	39
7. Научни трудове и публични изяви, свързани с дисертационния труд.....	40
7.1. Публикации.....	40
7.2. Участия в конференции и научни форуми.....	41

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ И СИМВОЛИ

$\alpha_{\text{цв}}\beta_3$ – интегрин; гликопротеин IIb/IIIa

Акт/РКВ – протеин киназа В

Anti ATP1A1 (**B**) – антитяло, специфично за α -субединицата на Na^+ - K^+ -АТФаза

Anti ATP1A1 P-Ser 16 (**A**) – антитяло, специфично за фосфорилиран Сер-16 в α -субединицата на Na^+ - K^+ -АТФаза

Anti-PI3-kinase p85- α/γ (**F**) – антитяло, специфично за регулаторната субединица на PI3K

Anti-PI3-kinase p85- α/γ (Phospho-Tyr467/199) (**E**) – антитяло, специфично за фосфорилиран Тир-467/199 в регулаторната субединица на PI3K

Anti PKA α/β (**D**) – антитяло, специфично за каталитичната субединица на PKA

Anti PKA α/β P-Thr197 (**C**) – антитяло, специфично за фосфорилиран Тре-197 в каталитичната субединица на PKA

ELISA – ензимно свързан имуносорбентен анализ

ERK – регулирана от екстрацелуларни сигнали киназа

KRDS – тетрапептид от човешки лактоглобулин

LRP – low density lipoprotein receptor-related protein – протеин, свързан с рецептора за нископлътностни липопротеини

MAPK – митоген активирана протеин киназа

NAD^+ – окислен никотинамидадениндинуклеотид

NADH – редуциран никотинамидадениндинуклеотид

NHE – Na^+/H^+ exchanger; Na^+/H^+ -обмящ белтък (антипортер)

OD – оптична плътност

p85 – регулаторна субединица във PI3K

p55 – регулаторна субединица във PI3K

PBS – фосфатно-солеви буфер

PDE – фосфодиестераза

PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа

PKA – протеин киназа А; цАМФ-зависимата протеин киназа

PKC – протеин киназа С

PP2A – протеин фосфатаза 2А

RGDS – тетрапептид от човешки фибриноген

SD – стандартно отклонение

Src – не-рецепторна протеин тирозин киназа

АТФ – аденозин трифосфат

Сер (Ser) – серин

Тир (Tyr) – тирозин

Тре (Thr) – треонин

ФФК-2/ФБФаза-2 – 6-фосфофрукто-2-киназа/ фруктозо-2,6-бисфосфатаза

цАМФ (сАМР) – циклически аденозин монофосфат

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Тромбоцитите играят ключова роля в нормалната и патологична хемостаза чрез способността си бързо да адхерират към активиран или увреден ендотел и субендотелни матриксни протеини (тромбоцитна адхезия), както и към други активирани тромбоцити (тромбоцитна агрегация). Редица са вътреклетъчните сигнални пътища, които регулират активирането на тромбоцитите и последващото им участие в процесите на адхезия и агрегация.

Някои модулатори на тромбоцитната агрегация упражняват своите ефекти, като използват за мишени, елементи от вътреклетъчни сигнални пътища. Такива са вортманинът, кверцетинът, кофеинът, амилоридът (инхибитори на тромбоцитната агрегация) и оуабаинът (активатор на тромбоцитите), които избрахме като агенти в провежданото проучване. Лактоферинът е естествен антикоагулант, притежаващ рецептори върху тромбоцитната мембрана. Клетъчните сигнали, които използва лактоферинът в тромбоцитите не са изследвани и за нас представляваше интерес да обогатим познанията относно участието му в регулацията на тромбоцитните функции.

Настоящият дисертационен труд има за цел да проучи механизмите, по които избраните модулатори на тромбоцитната агрегация осъществяват своя ефект, като се проверят възможностите за намесата им в процесите на ковалентна модификация на важни ензимни молекули. За целта, с клетъчно-базирана ELISA, изследвахме ефекта на вортманина, кверцетина, кофеина, оуабаина и амилорида върху фосфорилирането на специфични аминокиселинни остатъци в ключови вътреклетъчни и мембранни ензими, ангажирани в тромбоцитната агрегация – тирозин-467/199 (Тир-467/199) в регулаторната субединица на фосфатидилинозитол-3-киназата (PI3K), треонин-197 (Тре-197) в каталитичната субединица на протеин киназа А (PKA) и серин-16 (Сер-16) в $\alpha 1$ -субединицата на Na^+/K^+ -АТФаза.

За да погърсим връзка между антикоагулационния ефект на лактоферина и клетъчната сигнализация при тромбоцитите, проведохме експерименти, в които определяхме възможностите на последния да стимулира/инхибира ефектите на избраните агенти, които са едновременно модулатори на тромбоцитната активност и участници в сигнални пътища.

Тромбоцитната дейност се обезпечава енергийно от гликолизата. Интересен и малко проучен е въпросът за връзката на гликолитичния път със сигналната трансдукция при тромбоцити. Познанието на подобна(ни) връзка(и) би съдействала за подобряване на тромбоцитната биоенергетика и оптимизиране на протичащите процеси. За да отговорим на този въпрос, в част от експериментите изследвахме възможностите за образуване на лактат

(краен продукт на гликолизата) в присъствието на модулатори на клетъчните сигнали.

Лактоферинът е многофункционален белтък. Предишни изследвания показват, че лактоферинът едновременно участва в регулацията на еритроцитни сигнални пътища и е стимулатор на гликолизата. Една от задачите на дисертационния труд е да изследва, дали лактоферинът е регулатор на гликолизата в тромбоцити и дали този ефект е опосредстван от намесата на вътреклетъчни сигнални пътища.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящият дисертационен труд е да се изследва влиянието на модулатори на коагулацията, върху гликолизата и процеси на фосфорилиране в ензими, ангажирани с регулацията на тромбоцитните функции.

За реализиране на тази цел, бяха поставени следните задачи:

1. Да се изследва влиянието на избрани модулатори (лактоферин, вортманин, кофеин, кверцетин, амилорид и оуабаин) върху гликолизата в тромбоцитите, определено по количеството на образувания лактат.
2. Да се изследва ефекта на избраните модулатори върху степента на фосфорилиране на аминокиселинни остатъци, ключови за активността на три вътреклетъчни и мембранни ензими (Треонин-197 в протеин киназа А, Тирозин-467/199 във фосфатидилинозитол-3-киназата и серин-16 в Na^+/K^+ -АТФаза), ангажирани в регулацията на тромбоцитната агрегация.
3. Да се изследва промяната във вътреклетъчната концентрация на цАМФ, медиатор с антикоагулантен ефект, под действие на избраните модулатори.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изолиране на тромбоцити

Тромбоцити бяха получени от човешка кръв на здрави донори чрез неколкочкратно центрофугиране и промивания. Отделените тромбоцити бяха разтворени в 50 mM PBS, pH 7,4 (Maneva et al., 1993) до крайна концентрация:

- 100×10^6 клетки/ml за определяне на лактат, при работна концентрация 25×10^6 клетки/проба.
- 15×10^5 клетки/ml за определяне степента на фосфорилиране на Тре-197 в РКА, Тир-467/199 във P13K и Сер-16 в Na^+ - K^+ -АТФаза, при работна концентрация $1,5 \times 10^5$ клетки/проба.
- 25×10^6 клетки/ml за определяне количеството на вътреклетъчния цАМФ, при работна концентрация $2,5 \times 10^6$ клетки/проба.

Клетъчната концентрация беше определена чрез микроскопиране в камера на Бюркер. Всички процедури бяха проведени на стайна температура.

Инкубиране на тромбоцити

Изолираните тромбоцити бяха инкубирани за 30 мин. при температура 37°C (Cesar et al., 2006) в присъствие на различни концентрации модулатори (Sigma-Aldrich, USA) – лактоферин (кат.№ L0520-5MG), вортманин (кат.№ W1628-1MG), кофеин (кат.№ 27600-100G), кверцетин (кат.№ Q4951-10G), амилорид (кат.№ A4562-25MG) и оубаин (кат.№ O3125-250MG). Третираните с агенти тромбоцити, бяха непосредствено използвани за определяне количеството на лактат, вътреклетъчен цАМФ и степен на фосфорилиране.

Определяне съдържанието на лактат в тромбоцити

След изтичане времето за инкубация, тромбоцитите бяха центрофугирани, ресуспендирани в 10% трихлороцетна киселина и отново центрофугирани (Maneva et al., 2003), като 0,1 ml от получаващата се надутаежна течност беше използвана за последващото определяне на лактат. Методът се базира на редукция на пирувата в присъствие на NADH и лактат дехидрогеназа. За да се определи лактата, реакцията се провежда в излишък на NAD^+ , като абсорбцията на получаващия се NADH се измерва при 340 nm дължина на вълната (Marbach & Weil, 1967). Резултатите се изчисляват съобразно формула и се представят в μM .

Спектрофотометричните измервания са извършени на Beckman Coulter DU 800 Spectrophotometer.

Определяне степента на фосфорилиране на:

- **Тре-197 в РКА**, което се извършва с помощта на „РКА alpha/beta CAT (Phospho-Thr197) Colorimetric Cell-Based ELISA Kit“ (кат.№ CBP1201), произведен от Assay Biotechnology, САЩ;
- **Тир-467/199 във PI3K** с помощта на „PI3-kinase p85-alpha/gamma (Phospho-Tyr467/199) Colorimetric Cell-Based ELISA Kit“ (кат.№ CBP1475), произведен от Assay Biotechnology, САЩ;
- **Сер-16 в Na⁺-K⁺-АТФаза** с помощта на „Phospho-ATP1A1 (Ser16) Colorimetric Cell-Based ELISA Kit“ (кат.№ OKAG01579), произведен от Aviva Systems Biology, САЩ.

И в трите случая се използва колориметричен клетъчно-базиран ензимно-свързан имуносорбентен анализ (colorimetric cell-based ELISA). Целта на метода е да установи промяна в степента на фосфорилиране на Тре-197 в РКА, Тир-467/199 във PI3K и Сер-16 в Na⁺-K⁺-АТФаза, в третиран с горейзброените модулатори тромбоцити на база абсорбция при 450 nm. Това става, като се използват два типа антители: тип I – насочени срещу фосфорилирания прицелен остатък в ензима [Сер-16 в $\alpha 1$ -субединицата на Na⁺-K⁺-АТФаза (Anti ATP1A1 P-Ser 16 – **A**), Тре-197 в каталитичната субединица на РКА (Anti РКА α/β P-Thr197 – **C**) и Тир-467/199 в регулаторната субединица на PI3K (Anti-PI3-kinase p85- α/γ (Phospho-Tyr467/199) – **E**)] и тип II – насочени срещу ензима, независимо от степента на фосфорилиране на съответния остатък [$\alpha 1$ -субединицата на Na⁺-K⁺-АТФаза (Anti ATP1A1 – **B**), каталитичната субединица на РКА (Anti РКА α/β – **D**) и регулаторната субединица на PI3K (Anti-PI3-kinase p85- α/γ – **F**)].

След инкубиране на тромбоцитите с различни концентрации модулатори, съгласно протокола за работа, който е идентичен за трите кита, се добавят двата типа антители. Стойностите за оптичната плътност (OD), получени за фосфорилирания прицелен белтък (с антияло тип I) се нормализират, използвайки стойностите за оптична плътност (OD) получени за нефосфорилирания прицелен белтък (с антияло тип II) чрез съотношението OD₄₅₀ (тип I)/OD₄₅₀ (тип II). Така получените съотношения за пробите (тромбоцити третиран с модулатор) и за контролата (тромбоцити нетретиран с модулатор), според производителя, се съпоставят, напр. [OD₄₅₀ (тип I)/OD₄₅₀ (тип II)]_{модулатор1}/[OD₄₅₀ (тип I)/OD₄₅₀ (тип II)]_{контрола}; [OD₄₅₀ (тип I)/OD₄₅₀ (тип II)]_{модулатор2}/[OD₄₅₀ (тип I)/OD₄₅₀ (тип II)]_{контрола} и т.н. Стойността, която се получава показва колко пъти се повишава или понижава фосфорилирането на съответния аминокиселинен остатък, която представяме

в проценти, като за 100 % приемаме фосфорилирането на съответния остатък в контролата – клетки, които не са третирани с агент.

Определяне количеството на вътреклетъчния цАМФ

Извършва се с помощта на „Direct cAMP ELISA kit“ (кат.№ ADI-900-066), произведен от Enzo Life Sciences, САЩ.

След инкубацията с избраните от нас агенти, тромбоцитите се утаяват чрез центрофугиране и третира с 0,1 М HCl за пълен лизис. След повторно центрофугиране и утаяване на клетъчните остатъци, получената надутаечна тучност се отделя за определяне на цАМФ. Пригответените по този начин проби се добавят към гнездата на 96 ямкова плака. След това, към същите гнезда се добавя разтвор на цАМФ конюгиран с алкална фосфатаза, последван от добавяне на друг разтвор на заешко поликлонално анти тяло насочено към цАМФ. По време на едновременната инкубация, поликлоналното анти тяло свързва, на конкурентен принцип, цАМФ в пробата или конюгираният цАМФ. След промиване, се добавя субстрат, който дава жълто оцветяване, когато се катализира от алкалната фосфатаза намираща се върху цАМФ конюгата. След добавяне на стоп разтвор, получаващия се жълт цвят се отчита при 405 nm дължина на вълната. Количеството на сигнала е обратно пропорционално на количеството на цАМФ в пробата.

Ензимно-свързаните имуносорбентни анализи (ELISA) за определяне степента на фосфорилиране и количеството на вътреклетъчния цАМФ са проведени със система за ELISA анализ включваща миешко устройство – CombiWash и ELISA спектрофотометър – HumaReader HS (и двете произведени от HUMAN Diagnostics Worldwide, Германия).

Статистическа обработка

Статистическите анализи са извършени посредством независим Т-тест. Резултатите са представени като средно аритметично \pm стандартно отклонение ($\bar{X} \pm SD$). Получените стойности се приети за статистически достоверни, когато р-стойността е по-малка от 0,05. Ефектът на модулаторите върху продукцията на лактат, цАМФ и степента на фосфорилиране е представен в проценти.

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Ефект на лактоферина, вортманина, кофеина, кверцетина, амилорида и оуабанина върху гликолизата в човешки тромбоцити, определено по количеството на образувания лактат

4.1.1. Ефект на лактоферина върху гликолизата в тромбоцити

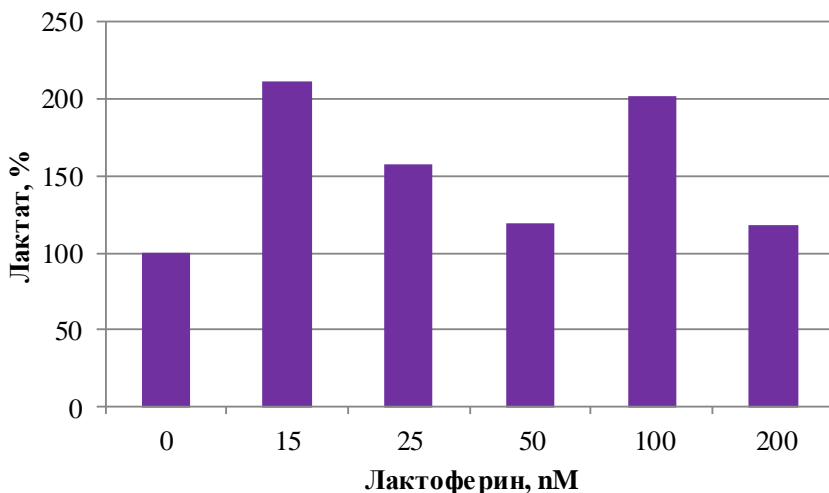
Лактоферинът проявява стимулиращ ефект върху гликолизата във всяка една от приложените концентрации (табл. 1).

Таблица 1. Продукция на лактат в присъствие на различни концентрации лактоферин.

Лактоферин, nM (n=7)	Лактат, μM ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	p	Стимулация, %
0	$1,531 \pm 0,851$	0	-
15	$3,238 \pm 1,985$	$> 0,05$	111,46
25	$2,412 \pm 0,403$	$< 0,001$	57,51
50	$1,817 \pm 0,936$	$> 0,1$	18,60
100	$3,095 \pm 1,705$	$< 0,025$	102,15
200	$1,800 \pm 0,407$	$> 0,1$	17,57

\bar{X} – средно аритметично; SD – стандартно отклонение; p – ниво на значимост; n – брой повторения.

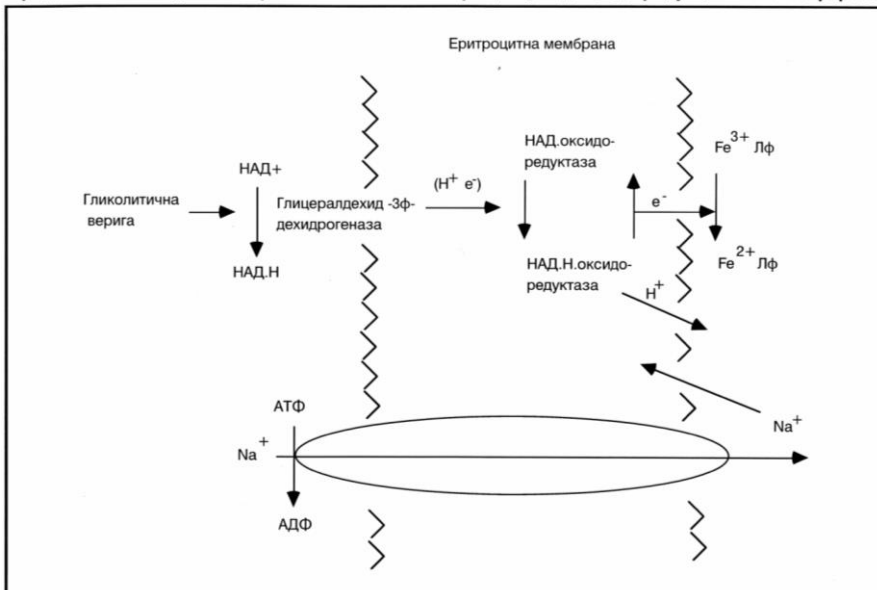
Най-голяма продукция на лактат се наблюдава при концентрации на лактоферина 15 nM и 100 nM (фиг. 1), съответно – $3,238 \mu\text{M}$ ($p > 0,05$) и $3,095 \mu\text{M}$ ($p < 0,025$) лактат, което съответства на установените два типа свързващи места за лактоферин върху тромбоцитната мембрана – едното с висок афинитет и нисък капацитет, а другото с нисък афинитет и висок капацитет (Maneva et al., 1993). Ефектът е достоверен при концентрации на лактоферина 25 nM и 100 nM (табл.1).



Фигура 1. Продукция на лактат (%) в присъствие на лактоферин – 15, 25, 50, 100, 200 nM. Концентрацията на лактат в отсъствие на лактоферин приемаме за 100%.

В експерименти с еритроцити е предложен модел на лактоферин-рецепторно взаимодействие (фиг. 2): лактоферинът, като краен мембранен акцептор на електрони (e^-) в електрон-транспортна верига, стимулира гликолизата, възстановявайки NAD^+ ; Fe^{3+} -лактоферин приема e^- от $NADH$, генериран при глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназната реакция. Този e^- редуцира Fe^{3+} -лактоферин до Fe^{2+} -лактоферин, като тази редукция е необходима за лактоферин-рецепторното взаимодействие (Maneva et al., 2003). Подобен механизъм на въздействие на лактоферина върху гликолизата е възможен и при тромбоцити. Тези „клетки“ свързват специфично лактоферина (Maneva et al., 1993). Сигналните пътища, които този модулатор иницира след свързването си с тромбоцитните мембранни рецептори все още не са известни. Ние предполагаме, че (1) лактоферинът използва съществуващите в тромбоцитите сигнали, водещи до инхибиране на тромбоцитната агрегация и, че (2) същите сигнали вероятно са свързани със стимулиращия му ефект върху гликолизата при тромбоцити.

Предполагам модел за веригата окислителни процеси, водещи до редукция на лактоферина



Фигура 2. Предполагам модел за окислителните процеси, водещи до редукция на лактоферина и стимулация на гликолизата в еритроцити (Манева, Дисертация, 2009).

Друга възможност за стимулиране на гликолизата е чрез дефосфорилиране и превръщане в активна ФФК-2 (6-фосфофрукто-2-киназа)/ФБФаза-2 (фруктозо-2,6-бисфосфатаза), посредством активиране на протеин фосфатаза 2А – PP2A (Pelech et al., 1984) от лактоферина. ФФК-2/ФБФаза-2 е отговорна за синтеза и разграждането на фруктозо-2,6-бисфосфат, който активира основния регулаторен ензим в гликолизата – ФФК-1 (6-фосфофрукто-1-киназа) (Pilkis et al., 1982). В опити с инхибитори на PP2A (Vize et al., 1999), е установено включване на PP2A в механизмите на активиране на гликолизата от лактоферина (Манева, Дисертация, 2009).

4.1.2. Ефект на вортманина, кофеина, кверцетина, амилорида и оубаина върху гликолизата в тромбоцити

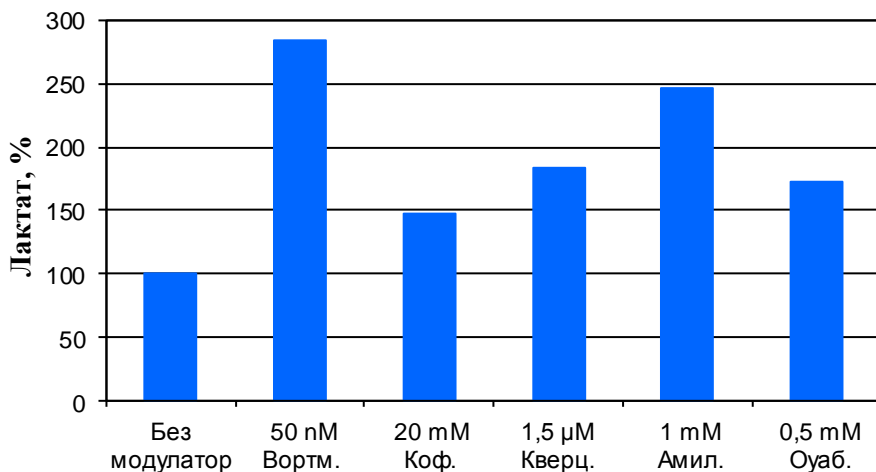
Всички използвани модулатори проявяват стимулиращ ефект върху гликолизата в човешки тромбоцити (табл. 2), за което няма информация в литературата.

Таблица 2. Продукция на лактат в присъствие на различни модулатори.

Модулатори (n=6)	Лактат, μM ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	p	Стимулация, %
Без модулатор	1,823 \pm 0,911	0	-
Вортманин, 50 nM	5,191 \pm 2,890	< 0,01	185
Кофеин, 20 mM	2,708 \pm 0,246	< 0,05	48
Кверцетин, 1,5 μM	3,360 \pm 1,508	< 0,05	84
Амилорид, 1 mM	4,485 \pm 0,671	< 0,001	146
Оуабаин, 0,5 mM	3,159 \pm 0,722	< 0,05	73

\bar{X} – средно аритметично; SD – стандартно отклонение; p – ниво на значимост; n – брой повторения.

Най-голяма продукция на лактат се наблюдава при инкубиране на тромбоцитите с вортманин (185%, p <0.01) и амилорид (146%, p <0.001) – табл.2, фиг.3.



Фигура 3. Влияние на различни модулатори върху продукцията на лактат (%) в тромбоцити *in vitro*. Концентрацията на лактат в отсъствие на агент приемаме за 100%. Вортм. – вортманин; Коф. – кофеин; Кверц. – кверцетин; Амил. – амилорид; Оуаб. – оуабаин.

Вортманинът стимулира образуването на лактат (табл. 2, фиг. 3). В същото време вортманинът е специфичен инхибитор на P13K (Yano et al., 1993). Това означава, че вътреклетъчен сигнален път с участието на P13K инхибира гликолизата в тромбоцити.

Вортманинът повишава нивата на цАМФ и активира PKA (Kolic et al., 2016; Nunoi et al., 2000). Установен е механизъм, чрез който PKA фосфорилира и активира PP2A (Ahn et al., 2007). ФФК-2/ФБФаза-2 се активира чрез дефосфорилиране под действие на PP2A (Pelech et al., 1984). Възможно е по този механизъм, вортманинът да стимулира гликолизата, което да е съпроводено с увеличена продукция на лактат (табл. 2, фиг. 3).

Кофенинът увеличава образуването на лактат (табл. 2, фиг. 3). Той е фосфодиестеразен инхибитор и като такъв стимулира образуването на цАМФ (Lev et al., 2007). Това води до активиране на PKA. Активираната PKA, може да фосфорилира и активира PP2A (Ahn et al., 2007), която на свой ред да дефосфорилира и активира ензимите от гликолизата (Pelech et al., 1984), с което да увеличи продуцирания лактат (табл. 2, фиг. 3).

Кверцетинът стимулира гликолизата (табл. 2, фиг. 3). Кверцетинът е редокс-система (Fiorani & Accorsi, 2005), която може да бъде краен акцептор на e^- , образувани в реакцията катализирана от глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназата (Chen & Deuster, 2009). По този начин той може да стимулира производството на лактат (табл. 2, фиг. 3).

Кверцетинът и негови производни повишават нивото на цАМФ в тромбоцитите (Oh et al., 2012; Wang & Duan, 2014). Увеличеният цАМФ може да активира PP2A (Ahn et al., 2007), която да стимулира гликолизата (табл. 2, фиг. 3).

Амилоридът е инхибитор на Na^+/H^+ -антипорта (NHE) в тромбоцити (Laeckmann et al., 2002). Нашите резултати показват стимулиране продукцията на лактат в присъствие на амилорид (табл. 2, фиг. 3). Амилоридът прекъсва изнасянето на протони извън клетката, като по този начин, вероятно повишава тяхната вътреклетъчна концентрация и оттам възможността за редукция на пирувата до лактат.

Оуабаинът е високо специфичен инхибитор на Na^+-K^+-ATP Фаза (Whittam et al., 1962), както и сигнален трансдуктор (Xie & Cai, 2003). Свързването на оуабаин към $Na-K$ -помпа, променя взаимодействието на ензима със съседните мембранни протеини, иницирайки образуването на сигналозома – комплекс с участието на различни сигнални молекули (Xie, 2003). В състава на този комплекс може да се включва и PP2A – фиг. 5 (Balasubramaniam et al., 2015) и това да доведе до дефосфорилиране и активиране на ензимите от гликолизата, съпроводено с увеличена продукция на лактат (табл. 2, фиг. 3).

4.1.3. Интерференция на модулатори на фосфорилирането и йонния транспорт с лактоферина върху регулация на гликолизата

Съвместното прилагане на лактоферин и вортманин (лактоферин/вортманин) и лактоферин и оуабаин (лактоферин/оуабаин) потиска продукцията на лактат с 49 % ($p < 0,05$) и 23 % ($p < 0,05$) съответно, спрямо самостоятелното прилагане на вортманин и оуабаин (табл.3). Третирането на тромбоцити с комбинацията модулатори лактоферин и кофеин (лактоферин/кофеин) стимулира гликолизата с 21 % ($p < 0,01$). Едновременното прилагане на лактоферин и кверцетин (лактоферин/кверцетин) и лактоферин и амилорид (лактоферин/амилорид) също стимулира продукцията на лактат, но ефектът е статистически недостоверен (табл.3). Наблюдаваните резултати са спрямо самостоятелното прилагане на кофеин, кверцетин и амилорид (табл.3).

Таблица 3. Съдържание на лактат в присъствие на модулатори и лактоферин.

Модулатори (n=10)	Лактат, μM ($\bar{X} \pm \text{SD}$)		p	Ефект, %
	Агент	Агент + Лактоферин (50 nM)		
Без модулатор	1,823 \pm 0,911	2,162 \pm 1,132	> 0,1	+ 19
Вортманин, 50 nM	5,191 \pm 2,890	2,661 \pm 0,300	< 0,05	- 49
Кофеин, 20 mM	2,708 \pm 0,246	3,280 \pm 0,475	< 0,01	+ 21
Кверцетин, 1,5 μM	3.360 \pm 1.508	2,741 \pm 0,374	> 0,1	+ 18
Оуабаин, 0,5 mM	3,159 \pm 0,722	2,436 \pm 0,516	< 0,05	- 23
Амилорид, 1 mM	4,485 \pm 0,671	5,390 \pm 1,756	> 0,1	+ 20

„+“ – стимулира гликолизата; „-“ – потиска гликолизата; \bar{X} – средно аритметично; SD – стандартно отклонение; p – ниво на значимост; n – брой на повторения.

Лактоферинът, вероятно използва PI3K-зависими сигнали в тромбоцити, тъй като стимулиращия му ефект върху гликолизата не се проявява в присъствие на **вортманин** (табл. 3). Инсулинът активира NHE в еритроцити по PI3K зависим път (Sauvage et al., 2000), водещо до активиране на гликолизата (Madshus, 1988). Лактоферинът усилюва Na^+/H^+ -антипорта (Sun et al., 1991) и стимулира гликолизата в еритроцити (Maneva et al., 2003) и тромбоцити (табл. 1). Възможно е по подобен PI3K-зависим път, лактоферинът да участва в контрола на тромбоцитната гликолиза.

Оуабаинът, като сигнален трансдуктор и инхибитор на Na^+/K^+ -АТФаза, може да участва в клетъчни сигнали, които антагонизират или

конкурират със стимулиращия ефект на лактоферина (Xie & Cai, 2003), което да доведе до понижена продукция на лактат в тромбоцитите при едновременно въздействие с лактоферин и оуабаин (табл.3).

В присъствие на **кофеин** и лактоферин се стимулира продукцията на лактат с 21 % (табл.3). Подобен стимулиращ ефект (19 %) се наблюдава и при въздействието само с лактоферин (табл.1, табл. 3). Възможно е кофеинът да инхибира протеин киназа(и) от лактоферинов сигнален път (Biovin et al., 1988; Dhennin-Duthille et al., 2000; Gusev & Agalakova, 2000; Takayama et al., 2003; Ueta et al., 2001), вероятно свързана(и) с регулация на гликолизата, тъй като е известно, че метилксантините инхибират независимите от циклични нуклеотиди протеин кинази, намиращи се на мембраната и в цитозола (Biovin et al., 1988). Лактоферинът може да се конкурира с кофеина за подобен(и) ензим(и) контролиращ(и) гликолизата в тромбоцити (табл. 3).

Получените от нас резултати (табл. 3) показват, че при регулация на гликолизата в тромбоцитите, лактоферинът се намесва в контролиран от РІЗК път (лактоферин/вортманин), вътреклетъчен сигнален път свързан с образуване на цАМФ (лактоферин/кофеин) и в клетъчните сигнали на оуабаина, който е едновременно инхибитор на работата на Na^+/K^+ -АТФаза и модулатор на сигнални пътища (табл. 3).

За да навлезем в по-фините механизми на регулация, упражнявани от използваните от нас модулатори, ние изследвахме влиянието им, както поотделно, така и в комбинация с лактоферин, върху ковалентната модификация на ключови аминокиселинни остатъци в основни вътреклетъчни и мембранни ензими, регулиращи поведението на тромбоцитите и повлияващи биоенергетиката на тези „клетки“.

4.2. Ефект на лактоферина, вортманина, кофеина, кверцетина, амилорида и оуабаина върху степента на фосфорилиране на Сер-16 в Na^+/K^+ -АТФаза, Тре-197 в РКА и Тир-467/199 във РІЗК

4.2.1. Ефект на лактоферина, вортманина, кофеина, кверцетина и оуабаина върху степента на фосфорилиране на Сер-16 в Na^+/K^+ -АТФаза

Na^+/K^+ -АТФаза е мембранно-свързан протеин, който генерира електрохимичен градиент, критичен за регулацията на клетъчния обем, вътреклетъчното рН и Ca^{2+} -нива в тромбоцитите (Borin & Siffert, 1991; Aviv, 1992; Marx *et al.*, 1992; Rosскопф, 1999). Фосфорилирането на Сер-16 в $\alpha 1$ -субединицата на Na^+/K^+ -помпа има отношение към активността на ензима. Установено е, че повишаването в степента на фосфорилиране на Сер-16 при

37°C е съпроводено с понижение в активността на Na⁺-K⁺-АТФаза в COS-7 клетки (Féaille et al., 2000).

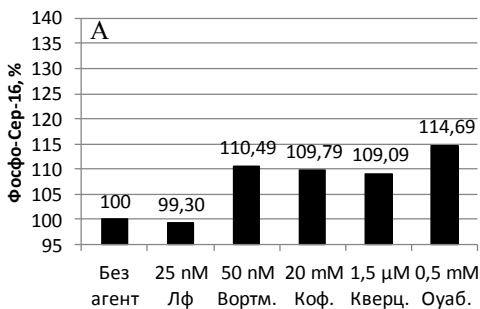
В табл.4. са представени осреднените абсорбционни стойности получени при инкубация с двата типа антитела (**A** и **B**) след третиране на тромбоцитите с модулаторите, съотношенията **A/B** и нивото на значимост (p) показващо доколко достоверно се повлиява фосфорилирането на Сер-16 под действие на съответните агенти.

Таблица 4. Фосфорилиране на Сер-16 в $\alpha 1$ -субединицата на Na⁺-K⁺-АТФаза.

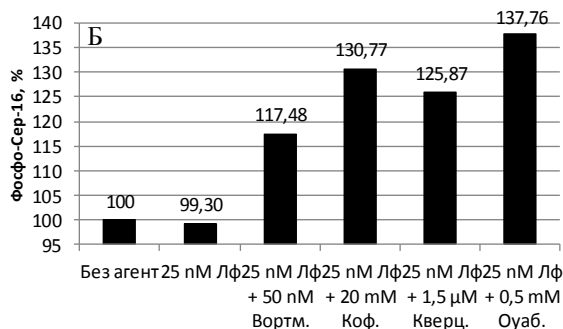
$n = 10$	Антитела	Anti ATP1A1 P-Ser 16 – A ($\bar{X}_{OD450} \pm SD$)	Anti ATP1A1 – B ($\bar{X}_{OD450} \pm SD$)	p	A/B
	Модулатори				
	Без агент	0,146 ± 0,035	1,018 ± 0,340	< 0,001	0,143
	Лактоферин (25 nM)	0,127 ± 0,037	0,896 ± 0,371	< 0,001	0,142
	Вортманин (50 nM)	0,134 ± 0,030	0,849 ± 0,258	< 0,001	0,158
	Кофеин (20 mM)	0,140 ± 0,036	0,893 ± 0,318	< 0,001	0,157
	Кверцетин (1,5 μ M)	0,145 ± 0,034	0,929 ± 0,207	< 0,001	0,156
	Оуабаин (0,5 mM)	0,145 ± 0,030	0,886 ± 0,178	< 0,001	0,164
	Лактоферин (25 nM) + Вортманин (50 nM)	0,145 ± 0,023	0,864 ± 0,179	< 0,001	0,168
	Лактоферин (25 nM) + Кофеин (20 mM)	0,158 ± 0,037	0,843 ± 0,182	< 0,001	0,187
	Лактоферин (25 nM) + Кверцетин (1,5 μ M)	0,155 ± 0,016	0,861 ± 0,038	< 0,001	0,180
	Лактоферин (25 nM) + Оуабаин (0,5 mM)	0,167 ± 0,022	0,848 ± 0,172	< 0,001	0,197

Anti ATP1A1 P-Ser 16 (**A**) – антитяло специфично за фосфо-Сер-16 в $\alpha 1$ -субединицата на Na⁺-K⁺-АТФаза; Anti ATP1A1 (**B**) – антитяло специфично за $\alpha 1$ -субединицата на Na⁺-K⁺-АТФаза; \bar{X}_{OD450} – средно аритметична абсорбционна стойност, получена при 450 nm дължина на вълната; SD – стандартно отклонение; p – ниво на значимост; n – брой повторения.

Всички използвани модулатори, самостоятелно и в комбинации, в приложените концентрации статистически достоверно повлияват фосфорилирането на Сер-16 (табл.4). Ефектът на това повлияване е представен на фиг.4 в проценти, като за 100 % приемаме фосфорилирането на Сер-16 в контролата – клетки, които не са третирани с агент.



Фигура.4. Степен на фосфорилиране на Сер-16 (%) под действие на модулаторите, приложени самостоятелно (А) и в комбинация с лактоферин (Б).



За 100 % приемаме фосфорилирането на Сер-16 в контролата – клетки, които не са третирани с агент.

Лф – лактоферин,
Вортм. – вортманин,
Коф. – кофеин,
Кверц. – кверцетин,
Оуаб. – оуабаин.

Вортманинът (50 nM), кофеинът (20 mM), кверцетинът (1,5 μM) и оуабаинът (0,5 mM) стимулират фосфорилирането на Сер-16 в α1-субединицата на Na⁺-K⁺-АТФаза от 9,09 % до 14,69 % (фиг. 4А). **Лактоферинът** (25 nM) не повлиява фосфорилирането на Сер-16 – понижава го едва с 0,7 % (фиг. 4). Лактоферинът обаче, повишава тирозиновото фосфорилиране на мембранни белтъци (Kobayashi et al., 2005). В бъбречни епителни клетки е установено, че α1-субединицата на Na⁺-K⁺-АТФаза може да бъде фосфорилирана на Тир-537 от тирозин кинази, което фосфорилиране е необходимо за инициране на вътреклетъчен сигнален път (Done и съавт. 2002). Лактоферинът активира Na⁺-K⁺-АТФаза в еритроцити, което може да се дължи на стимулиращия му ефект върху NHE (Sun et al., 1991) или на промени във фосфорилирането на ензима (Maneva et al., 2007). Лактоферин-рецепторното взаимодействие може да причини конформационни промени, водещи до промяна в достъпа на ензими, фосфорилиращи Na-помпа: РКА и РКС могат да фосфорилират α-субединицата в определена конформация, в зависимост от клетъчния тип (Feschenko & Sweadner, 1994).

Лактоферинът увеличава стимулиращия ефект на вортманина, кофеина, кверцетина и оуабаина, тъй като приложен съвместно с тях, допълнително повишава фосфорилирането на Сер-16 – от 17,48 % до 37,76 % (фиг. 4Б). Това показва намеса на РІЗК (вортманин), цАМФ-РКА-път (кофеин), промени в мембранното редокс-състояние (кверцетин), промени в степента на фосфорилиране на белтъци (вортманин, кофеин, кверцетин и оуабаин) в механизмите на биологична активност на лактоферина при тромбоцити.

Известно е, че **оуабанинът** инхибира Na-помпа в човешки еритроцити и в Т84 клетки (Whittam et al., 1962; Ecaу et al., 2000) и също така повишава фосфорилирането на Сер-16 в $\alpha 1$ -субединицата на Na-K-помпа при плъши паротидни клетки (Soltoff et al., 2010). Нашите резултати показват, че оуабанинът повишава степента на фосфорилиране на Сер-16 в $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$ с 14,69 % (фиг. 4А), което предполага понижена активност на мембранната помпа и са в съответствие с наблюдениято, че същият образува комплекс с $\alpha 1$ -субединицата в тромбоцитите (Blanco & Mercer, 1998).

Чрез *in vitro* експерименти, Ogundajo et al. (2014) установяват, че **кверцетинът** е инхибитор на мозъчната $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$ при плъхове. Година по-късно, Ogundajo и Imogu (2015) намират, чрез експерименти *in vitro* и *in vivo*, че кверцетинът инхибира и чернодробната $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$ при плъхове. Тези данни са в подкрепа на получените от нас резултати според които кверцетинът повишава степента на фосфорилиране на Сер-16 в Na-K-помпа с 9,09 % (фиг. 4А), което предполага понижена активност на мембрания ензим (Féraille et al., 2000). Вероятно, това е един от механизмите, чрез които кверцетинът инхибира активността на $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$ – като повишава фосфорилирането на Сер-16 в $\alpha 1$ -субединицата на помпата.

Вортманинът, доказан инхибитор на РІЗК (Yano et al., 1993), инхибира и $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$ при Т84 клетъчна линия, получена от клетки на дебелото черво при човека (Ecaу et al., 2000). Авторите доказват още, че вортманинът не инхибира активността на $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -помпа директно, нито пък намалява общото съдържание на ензима в клетката, което означава, че не прекъсва сигналния път, произхождащ от $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$. Според Ecaу et al. (2000), този модулатор само променя степента на екзо- и ендоцитоза на Na-помпа на базолатералната мембрана, с което намалява общата активност на ензима.

Получените от нас резултати показват, че вортманинът повишава фосфорилирането на Сер-16 с 10,49 % в сравнение с контролата (фиг. 4А), което означава, че използваният модулатор повлиява фосфорилирането на този ключов аминокиселинен остатък, а от там и активността на $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -помпа, като съгласно данните от литературата, я понижава (Féraille et al.,

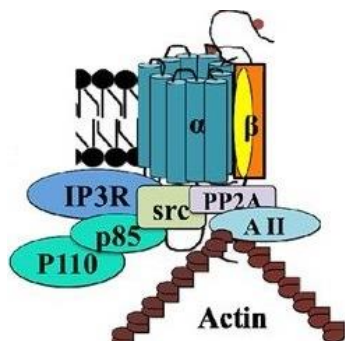
2000). Тъй като вортманинът е специфичен инхибитор на P13K (Yano et al., 1993), данните от проучването показват, че зависим от P13K-път е включен в контрола на $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$.

Кофеинът, освен инхибитор на фосфодиестеразите – PDEs (Feneck, 2007), инхибира и активността на $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$ с 62 % в панкреатични островни клетки на плъх (Tung et al., 1990). През 2002 г., Lee et al. доказват, че в бъбречни клетки на третирани с кофеин плъхове се понижава експресията на $\alpha 1$ и $\beta 1$ -субединиците на $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-помпа}$, както и на NHE3, което на свой ред води и до понижение на каталитичната активност на $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$. Не е установено влиянието на кофеина върху тромбоцитната $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-помпа}$ и как този метилксантин повлиява фосфорилирането на Ser-16 в $\alpha 1$ -субединицата. Нашите резултати показват, че кофеинът повишава степента на фосфорилиране на Ser-16 с 9,79 % в сравнение с контролата (фиг. 4A), което означава, че фосфодиестеразният инхибитор повлиява фосфорилирането и на този ключов аминокиселинен остатък, а от там и на активността на $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-помпа}$, като я понижава (Féraille et al., 2000). Получените резултати показват вероятно участие на зависим от цАМФ-път (Lev et al., 2007) и/или на чувствителни към ефекта на кофеина протеин кинази (Biovin et al., 1988).

В проведените от нас експерименти, вортманинът, кофеинът, кверцетинът и оубаинът стимулират както гликолизата (фиг. 3), така и фосфорилирането на Ser-16 (фиг. 4). Повишеното фосфорилиране на този аминокиселинен остатък се свързва с понижена активност на мембранната $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$ (Féraille et al., 2000). Различни автори наблюдават ендоцитоза на $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$ (Esay et al., 2000; Khundmiri et al., 2004) изискваща ERK-зависимо фосфорилиране на Ser-16 в $\alpha 1$ -субединицата на мембрания ензим (Khundmiri et al., 2004). Според Esay et al. (2000), ендоцитозата намалява общата активност на ензима, но не намалява общото съдържание на ензима в клетката, което означава, че не прекъсва сигналния път произхождащ от $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$. В миокардни клетки, свързването на оубаин към $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$ иницира образуването на сигналозома на мембраната, с участието на голям брой молекули, от която тръгва вътреклетъчен сигнален път, стимулиращ клетъчния растеж (Xie & Cai, 2003). Balasubramaniam et al. (2015) установяват, че PP2A също може да бъде част от такава сигналозома, тъй като каталитичната субединица на PP2A взаимодейства с $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$ в COS клетки (Kimura et al., 2011) – фиг. 5.

Процесите на гликолиза и йонен транспорт са взаимно зависими, тъй като $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$ изнася Na -йони доставяни с NHE. Това е необходимо, за да продължава работата на антипорта, изнасящ протони и поддържащ по този начин активна гликолизата. Ние предполагахме още една възможна връзка

между двата процеса в тромбоцитите: PP2A свързана към Na⁺-K⁺-АТФаза в мембранната сигнализация – фиг.5 (Balasubramaniam et al., 2015), би могла да дефосфорилира белтъци, регулиращи гликолизата (Pelech et al., 1984), което свързва контрола върху Na-помпа и процесите на тромбоцитна биоенергетика (фиг. 1, 3).



Фигура 5. Протеин-протеин взаимодействия медирани от субединиците на Na⁺-K⁺-АТФаза. PP2A – протеин фосфатаза 2А; IP3R – рецептор за инозитол 1,4,5-трифосфат (Balasubramaniam et al., 2015).

4.2.2. Ефект на лактоферина, вортманина, кофеина, кверцетина и амилорида върху степента на фосфорилиране на Тре-197 в РКА

РКА е серин/треонинова киназа, която се активира при повишена вътреклетъчна концентрация на цАМФ. В тромбоцитите, РКА провежда антикоагулантните ефекти на цАМФ, като фосфорилира и по този начин инактивира множество елементи в тромбоцит-активиращите сигнални пътища (Cavallini et al., 1996; Wojcikiewicz et al., 1998; Yue et al., 1998; Walsh et al., 2000). Самият ензим може да се подлага фосфорилиране и така допълнително да се регулира неговото действие. Установено е, че фосфорилирането на Тре-197 в каталитичната субединица на РКА е съпроводено с повишение в активността на ензима (Steinberg et al., 1993).

В табл.5. са представени осреднените абсорбционни стойности получени при инкубация с двата типа антитела (**C** и **D**) след третиране на тромбоцитите с модулаторите, съотношенията **C/D** и нивото на значимост (p) показващо доколко достоверно се повлиява фосфорилирането на Тре-197 под действие на агентите.

Степента на фосфорилиране на треониновия остатък е представена на фиг.6 в проценти, като за 100 % приемаме фосфорилирането на Тре-197 в контролата – клетки, които не са третирани с агент.

Таблица 5. Фосфорилиране на Тре-197 в каталитичната субединица на РКА.

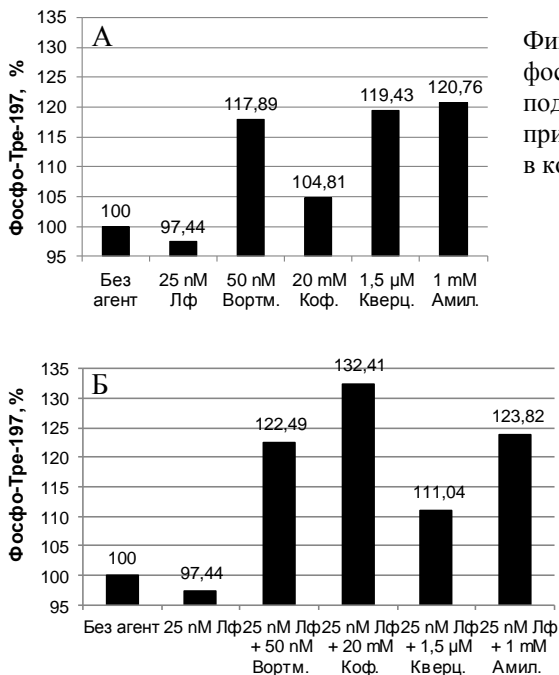
$n = 10$	Антитела	Anti PKA α/β P-Thr197 – C ($\bar{X}_{OD450} \pm SD$)	Anti PKA α/β – D ($\bar{X}_{OD450} \pm SD$)	p	C/D
	Модулатори				
	Без агент	0,961 \pm 0,009	0,983 \pm 0,013	< 0,001	0,978
	Лактоферин (25 nM)	0,908 \pm 0,034	0,953 \pm 0,019	< 0,01	0,953
	Вортманин (50 nM)	0,952 \pm 0,078	0,826 \pm 0,098	< 0,01	1,153
	Кофеин (20 mM)	0,947 \pm 0,031	0,924 \pm 0,008	< 0,05	1,025
	Кверцетин (1,5 μ M)	0,978 \pm 0,028	0,837 \pm 0,109	< 0,001	1,168
	Амилорид (1 mM)	1,009 \pm 0,041	0,854 \pm 0,155	< 0,01	1,181
	Лактоферин (25 nM) + Вортманин (50 nM)	0,954 \pm 0,071	0,796 \pm 0,192	< 0,05	1,198
	Лактоферин (25 nM) + Кофеин (20 mM)	0,970 \pm 0,079	0,749 \pm 0,191	< 0,01	1,295
	Лактоферин (25 nM) + Кверцетин (1,5 μ M)	0,961 \pm 0,062	0,885 \pm 0,125	> 0,05	1,086
	Лактоферин (25 nM) + Амилорид (1 mM)	0,977 \pm 0,039	0,807 \pm 0,157	< 0,01	1,211

Anti PKA α/β P-Thr197 (**C**) – антияло специфично за фосфо-Тре-197 в каталитичната субединица на РКА; Anti PKA α/β (**D**) – антияло специфично за каталитичната субединица на РКА; \bar{X}_{OD450} – средно аритметична абсорбционна стойност, получена при 450 nm дължина на вълната; SD – стандартно отклонение; p – ниво на значимост; n – брой повторения.

Вортманинът (50 nM), кофеинът (20 mM), кверцетинът (1,5 μ M) и амилоридът (1 mM) стимулират фосфорилирането на Тре-197 в каталитичната субединица на РКА от 4,81 % до 20,76 % (фиг. 6А).

Тъй като, фосфорилирането на Тре-197 повишава активността на РКА (Steinberg et al., 1993), ние предполагаме, че тези модулатори ще повишават активността на ензима и в човешки тромбоцити. Доказано е, че активираната РКА инхибира тромбоцитната активация, адхезия и агрегация (Cavallini et al., 1996; Wojcikiewicz et al., 1998; Yue et al., 1998; Walsh et al., 2000). По този начин, получените от нас резултати подкрепят съществуващите в литературата данни, според които вортманинът, кофеинът, кверцетинът и амилоридът са инхибитори на тромбоцитната агрегация (Kovacsovic et al., 1995; Montoya et al., 2014; Oh et al., 2012; Siffert et al.,

1986). Фосфорилирането на Тре-197 може да се явява един допълнителен способ, чрез който тези агенти потискат тромбоцитните функции.



Фигура.6. Степен на фосфорилиране на Тре-197 (%) под действие на модулаторите, приложени самостоятелно (А) и в комбинация с лактоферин (Б).

За 100 % приемаме фосфорилирането на Тре-197 в контролата – клетки, които не са третирани с агент.

Лф – лактоферин,
Вортм. – вортманин,
Коф. – кофеин,
Кверц. – кверцетин,
Амил. – амилорид.

Лактоферинът, приложен самостоятелно, инхибира много слабо фосфорилирането на Тре-197 в РКА (фиг. 6) и повишава съвсем слабо вътреклетъчния цАМФ в човешки тромбоцити (фиг. 8). Тези резултати показват, че вероятно: 1) системата на цАМФ не се използва от лактоферина при регулацията на тромбоцитните функции или 2) има неутрализиращи ефекти, които „маскират“ подобна интерференция на цАМФ-РКА-пътя в ефектите на лактоферина. Ние считаме за по-правдоподобно второто допускане.

Лактоферинът използва РКА-зависими сигнали при стимулация на остеобластната диференциация (Zhang et al., 2014). РКА е необходима за интернализацията на лактоферина свързан към LRP (Goretzki & Mueller, 1997). От друга страна, зависим от РКА път води до фосфорилиране на човешки лактоферин, фрагмент от лактоферина, което е свързано с понижаване в биологичната му активност (Maekawa et al., 2002). Това показва,

че РКА е регулатор на биологичните ефекти на лактоферина, като вероятно последният е ангажиран в регулацията на РКА чрез фосфорилиране на различни от Тре-197 аминокиселинни остатъци и/или активиране на PP2A (Манева, Дисертация, 2009). Това би довело до понижаване в степента на фосфорилиране на Тре-197. Също така е възможно ангажиране на лактоферина в различни процеси на фосфорилиране (Hou et al., 2015; Uchida et al., 2017), които конкурират за АТФ, субстрат на аденилат циклазата, и това да е причина за несъществената промяна в съдържанието на цАМФ в присъствие на лактоферин.

Лактоферинът (25 nM) увеличава стимулиращия ефект на вортманина, кофеина и амилорида, тъй като съвместното му прилагане с всеки един от тези модулатори (лактоферин/вортманин, лактоферин/кофеин и лактоферин/амилорид) допълнително стимулира фосфорилирането на Тре-197 с до 22,49 %, 32,41 % и 23,82 % съответно (фиг. 6Б), но отслабва стимулиращия ефект на кверцетина, тъй като приложени заедно повишават фосфорилирането на Тре-197 само с 11,04 % – фиг. 6Б (ефектът не е статистически достоверен – табл. 5).

В литературата няма данни за изследване активността на РКА при едновременно третиране с лактоферин и някой друг от използваните от нас агенти. Ние предполагаме синергизъм на действието между лактоферина и всеки един от останалите три модулатора (вортманин, кофеин и амилорид), което би довело до инхибиране на тромбоцитната агрегация, както е и ефекта на агентите приложени самостоятелно (Leveugle et al., 1993; Kovacsovics et al., 1995; Montoya et al., 2014; Siffert et al., 1986). Възможно е, стимулиращият ефект на лактоферина да се дължи на подобряване на биоенергетиката и доставяне на АТФ за различни фосфорилирания.

Причина за повишеното фосфорилиране в присъствие на **вортманин** (фиг. 6А) може да бъде увеличено образуване на цАМФ поради улеснен достъп до АТФ, тъй като вортманинът освен Р13К, инхибира фосфорилирането и активирането на Akt, ERK, киназата на гликоген синтазата 3 α / β (Moroj & Watson, 2015), както и транслокацията и активирането на казеин киназа 2 (Nakanishi et al., 2010).

Вортманинът от друга страна, повишава нивата на цАМФ и активира РКА (Kolic et al., 2016; Nunoi et al., 2000). Установено е, че активният фрагмент от лактоферина – лактоферицин, може да се фосфорилира по зависим от РКА път и това да доведе до редуциране на активността му (Maekawa et al., 2002). Възможно е по този начин да се отслабва ефекта на лактоферина върху Р13К-път, което допълнително да повиши фосфорилирането на Тре-197 в РКА при едновременно прилагане на лактоферин/вортманин (фиг. 6Б).

Повишеното фосфорилиране на Тре-197 в присъствие на **кофеин** (фиг. 6А) може да се дължи на установената обратна връзка между РКА и PDE3, която поддържа нормално ниво на цАМФ в тромбоцитите: РКА, която се активира от повишени нива на цАМФ в тромбоцитите, инхибира впоследствие аденилат циклазата, но също така активира PDE3 (Wangorsch et al., 2011). Лактоферинът допълнително увеличава фосфорилирането на Тре-197 в присъствие на кофеин (фиг. 6Б), което вероятно се дължи на комбинирано участие на лактоферина и кофеина в сигнал(ни) път(ища) включващ(и) РКА.

Установено е, че аналози на **амилорида**, какъвто е и използваният от нас **5-(N,N-Диметил)амилорид хидрохлорид**, са мощни стимулатори на активността на РКА (Feldman & Dixon, 1993). Това може да бъде причина за увеличеното фосфорилиране на Тре-197 в РКА (фиг. 6А). Човешкият NHE1 е мембранен адапторен протеин за ERK2 (Hendus-Altenburger et al., 2016). Лактоферинът би могъл да се конкурира с NHE1 за ERK2, което да доведе до усилване стимулиращия ефект на амилорида върху фосфорилирането на Тре-197 в РКА (фиг. 6Б).

Основният отворен въпрос при цАМФ-сигнализацията в тромбоцити е кои са всички субстрати на РКА и как се координира тяхното действие. Динамичната клетъчна сигнализация включва протеинови фосфорилирания от кинази и дефосфорилирания от фосфатази. Няколко проучвания предполагат възможността, цАМФ да стимулира дефосфорилиране на протеини, освен нормално приетата роля на цАМФ като стимулатор на протеиновото фосфорилиране (Christoffersen et al., 1994; Begum et al., 1992; Mukhopadhyay et al., 1998; Kim et al., 2006). Протеин фосфатаза 1, протеин фосфатаза 2А и протеин фосфатаза 2В са някои от серин/треонин фосфатазите съобщени до момента, за които се знае, че регулират различни тромбоцитни функционални отговори (Gushiken и др, 2008; Vijayan и др, 2005).

Ahn et al. (2007) установяват механизъм, според който протеин фосфатаза 2А (PP2A) се активира от цАМФ/РКА-зависим път. Субстрат на PP2A е ФФК-2 (6-фосфофрукто-2-киназа)/ФБФаза-2 (фруктозо-2,6-бисфосфатаза) (Pelech et al., 1984).

ФФК-2/ФБФаза-2 катализира синтеза и разграждането на фруктозо-2,6-бисфосфат, който е активатор на ФФК-1 (6-фосфофрукто-1-киназа) – основен регулаторен ензим на гликолизата и инхибитор на фруктозо-1,6-бисфосфатазата (Pilkis et al., 1982). ФФК-2/ФБФаза-2 е бифункционален ензим, изграден от една полипептидна верига (Pilkis et al., 1984). Фосфорилирането на серинов остатък във ФФК-2/ФБФаза-2 (Murray et al., 1984) води до инактивиране на ФФК-2 и активиране на ФБФаза-2 (Pilkis et al., 1984). Дефосфорилирането на ФФК-2 под действие на серин/треонин

фосфатазата PP2A ще доведе до активирането ѝ, съпроводено с увеличена гликолиза.

Вортманинът, кофеинът, кверцетинът и амилоридът повишават продукцията на лактат в изолирани човешки тромбоцити (фиг. 3, табл. 2). Имайки предвид, че тези агенти повишават фосфорилирането на Тре-197 в РКА (фиг. 6А), което е съпроводено с повишена активност на ензима (Steinberg et al., 1993), възможно е така активираната РКА да активира в следствие PP2A, чрез фосфорилиране на регулаторната ѝ субединица. Активираната PP2A ще активира ензимите от гликолизата, като ги дефосфорилира и така ще усили гликолитичния път и съответно продукцията на лактат.

Освен това е установено, че PP2A потиска интегриновата $\alpha_{IIb}\beta_3$ сигнализация (Gushiken et al., 2008). $\alpha_{IIb}\beta_3$ е главният тромбоцитен интегрин, медиращ адхезивните взаимодействия тромбоцит-тромбоцит и тромбоцит-съдова стена (Ruggeri, 2002). Инактивирането му ще попречи на образуването на тромби. Тъй като вортманинът, кофеинът, кверцетинът и амилоридът са инхибитори на тромбоцитната агрегация (Kovacsovics et al., 1995; Montoya et al., 2014; Oh et al., 2012; Siffert et al., 1986), възможно е тези агенти, активирайки РКА, чрез повишаване на фосфорилирането ѝ (фиг. 6А), да активират PP2A, която да изключи интегрината $\alpha_{IIb}\beta_3$ и така да проявят своя антикоагулантен ефект. Описаната последователност от вътреклетъчни събития, може да е още един механизъм, чрез който изброените модулатори да дезактивират тромбоцитите.

4.2.3. Ефект на лактоферина, вортманина, кофеина, кверцетина, оуабайна и амилорида върху степента на фосфорилиране на Тир-467/199 във РІЗК

Повишеното фосфорилиране на Тир-467/Тир-199 от регулаторната субединица (p85/p55) на РІЗК стимулира активността на ензима (Yu et al., 2009). Тъй като активната РІЗК е необходима за активирането на основния тромбоцитен интегринов рецептор $\alpha_{IIb}\beta_3$, участващ в тромбоцитната агрегация, регулацията на ензима чрез обратима ковалентна модификация по типа фосфорилиране/дефосфорилиране, играе важна роля в поведението на тромбоцитите.

На табл.6 са представени осреднените абсорбционни стойности получени при инкубация с двата типа антитела (**Е** и **Ф**) след третиране на тромбоцитите с модулаторите, съотношенията **Е/Ф** и нивото на значимост (p) показващо доколко достоверно се повлиява фосфорилирането на Тир-467/199 под действие на съответните агенти.

Таблица 6. Фосфорилиране на Тир-467/199 в регулаторната субединица на PI3K.

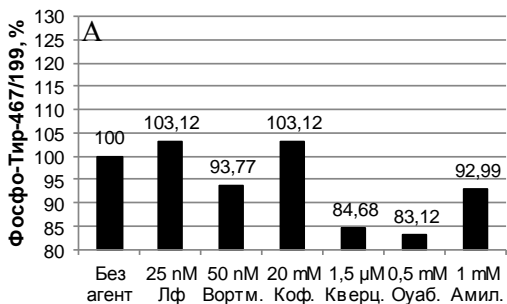
Антитела n = 10	Anti-PI3-kinase p85- α/γ (Phospho-Тир467/199) – E ($\bar{X}_{OD450} \pm SD$)	Anti-PI3-kinase p85- α/γ – F ($\bar{X}_{OD450} \pm SD$)	p	E/F
Модулатори				
Без агент	0,454 \pm 0,020	1,180 \pm 0,049	< 0,001	0,385
Лактоферин (25 nM)	0,374 \pm 0,044	0,942 \pm 0,104	< 0,001	0,397
Вортманин (50 nM)	0,378 \pm 0,034	1,047 \pm 0,115	< 0,001	0,361
Кофеин (20 mM)	0,382 \pm 0,022	0,963 \pm 0,207	< 0,001	0,397
Кверцетин (1,5 μ M)	0,313 \pm 0,031	0,960 \pm 0,045	< 0,001	0,326
Оуабаин (0,5 mM)	0,320 \pm 0,027	1,001 \pm 0,049	< 0,001	0,320
Амилорид (1 mM)	0,349 \pm 0,007	0,974 \pm 0,073	< 0,001	0,358
Лактоферин (25 nM) + Вортманин (50 nM)	0,383 \pm 0,016	0,870 \pm 0,009	< 0,001	0,440
Лактоферин (25 nM) + Кофеин (20 mM)	0,421 \pm 0,037	0,874 \pm 0,015	< 0,001	0,482
Лактоферин (25 nM) + Кверцетин (1,5 μ M)	0,384 \pm 0,023	0,949 \pm 0,049	< 0,001	0,405
Лактоферин (25 nM) + Оуабаин (0,5 mM)	0,367 \pm 0,019	1,031 \pm 0,050	< 0,001	0,356
Лактоферин (25 nM) + Амилорид (1 mM)	0,323 \pm 0,018	0,873 \pm 0,084	< 0,001	0,370

Anti-PI3-kinase p85- α/γ (Phospho-Тир467/199) (**E**) – антияло специфично за фосфо-Тир-467/199 в регулаторната субединица на PI3K; Anti-PI3-kinase p85- α/γ (**F**) – антияло специфично за регулаторната субединица на PI3K; \bar{X}_{OD450} – средно аритметична абсорбционна стойност, получена при 450 nm дължина на вълната; SD – стандартно отклонение; p – ниво на значимост; n – брой повторения.

Ефектът на модулаторите върху фосфорилирането е представен на фиг.7 в проценти, като за 100 % приемаме фосфорилирането на Тир-467/199 в контролата – клетки, които не са третирани с агент.

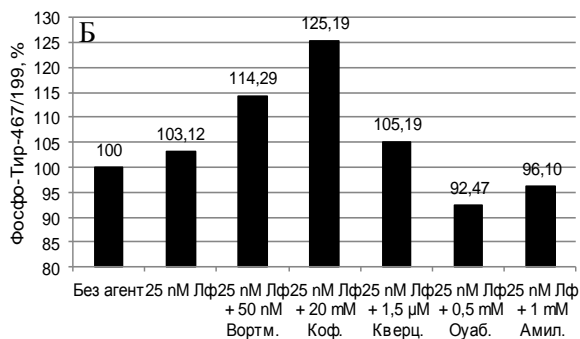
Вортманинът (50 nM) и кверцетинът (1,5 μ M) понижават фосфорилирането на Тир-467/199, съответно с 6,23 % и 15,32 % (фиг. 7А), но едновременното им прилагане с лактоферин (25 nM), го повишава с 14,29 % и

5,19 % (фиг. 7Б). Оуабаинът (0,5 mM), амилоридът (1 mM) и съвместното им прилагане с лактоферин (25 nM) потискат фосфорилирането на Тир-467/199, съответно с 16,88 %, 7,01 % (фиг. 7А) и 7,53 % и 3,9 % (фиг. 7Б). Лактоферинът (25 nM) и кофеинът (20 mM), приложени самостоятелно, стимулират незначително фосфорилирането на Тир-467/199 с 3,12 % (фиг. 7А), но едновременното им прилагане повишава фосфорилирането с 25,19 % (фиг. 7Б).



Фигура.7. Степен на фосфорилиране на Тир-467/199 (%) под действие на модулаторите, приложени самостоятелно (А) и в комбинация с лактоферин (Б).

За 100 % приемаме фосфорилирането на Тир-467/199 в контролата – клетки, които не са третираны с агент.



Лф – лактоферин,
Вортм. – вортманин,
Коф. – кофеин,
Кверц. – кверцетин,
Оуаб. – оуабаин,
Амил. – амилорид.

Лактоферинът, приложен самостоятелно не променя съществено фосфорилирането на Тир-467/199 във РІЗК (фиг. 7). Свързването на лактоферин с мембранни рецептори (Maneva et al., 1993), вероятно иницира конформационни промени, които водят до образуване на сигнален комплекс в който са привлечени модулаторите, РІЗК и Src. Src е тирозин киназа, която фосфорилира Тир-467/199 във РІЗК (Yu et al., 2009). Достъпът на Src до Тир-467/199 и активиране на тирозиновото фосфорилирането от тази киназа в рамките на комплекса, вероятно се усилва при комбинираното прилагане на лактоферин и модулатори (фиг. 7Б).

Вортманинът е стимулатор на тромбоцитната гликолиза, като повишава около 3 пъти количеството на образуващия се лактат, което предства РІЗК като отрицателен регулатор на гликолизата (фиг. 3).

Лактоферинът инхибира ефекта на вортманина около 2 пъти (табл. 3), което показва участие в сигнален път усилващ активността на РІЗК. Вероятно лактоферинът няма пряко, а косвено участие в контрола на РІЗК, тъй като повишава в незначителна степен Тир-467/199 фосфорилирането на РІЗК в условията на експеримента (фиг. 7). Възможно е лактоферинът да активира тромбоцитни тирозинови кинази, намиращи се в началото на сигнален(ни) път(ища) и пренасящи ефекта по посока надолу, активирайки и фосфорилирайки РІЗК, тъй като е известно, че последният повишава тирозиновото фосфорилиране на мембранни белтъци в различни клетъчни типове (Tanaka et al., 1998; Kobayashi et al., 2005).

Известно е, че една от възможностите на активираната РІЗК е да инхибира тромбоцитната агрегация чрез активиране на протеин киназа G (Li et al., 2010; Smolenski, 2012). Възможно е в подобен сигнален път лактоферинът да бъде положителен регулатор, а вортманинът – отрицателен, като сумарното въздействие с лактоферин и вортманин да доведе до понижение на стимулиращия ефект на вортманина (табл. 3). Тази възможност се подкрепя от получените резултати в експериментите с фосфорилиране: в присъствие на лактоферин/вортманин има с 14% стимулация на фосфорилирането на Тир-467/199 във РІЗК (фиг. 7Б), като е неутрализиран инхибиращия ефект (6%) на приложения самостоятелно вортманин (фиг. 7А).

Кофеинът стимулира гликолизата в тромбоцити (фиг. 3). Лактоферинът стимулира с 21% ефекта на кофеина (табл. 3), като вероятно участва в синергични на кофеина механизми, водещи до повишение съдържанието на дефосфорилираните форми на гликолитичните ензими (Probst et al., 1985), необходими за стимулиране на гликолизата.

Подобно на лактоферина, кофеинът самостоятелно повишава в незначителна степен фосфорилирането на РІЗК (фиг. 7А), но едновременното действие на лактоферин/кофеин води до стимулиране на фосфорилирането на Тир-467/199 с 25% (фиг. 7Б). Известно е, че РІЗК е стимулатор на тромбоцитната агрегация, а лактоферинът и кофеинът имат антикоагулантни ефекти. Установено е, че сигналната трансдукция започва с конформационни промени на мембранни протеини, след свързването на лиганд към рецептор. Лактоферин-рецепторното взаимодействие в хипотетична сигналозома може да доведе до промяна в хидрофобните взаимодействия на кофеина с мембранни протеини (Sato et al., 1990). Подобно лактоферин-рецепторно взаимодействие може не само да неутрализира инхибиторния ефект на кофеина, но и да повиши степента на Тир-467/199 фосфорилиране, улеснявайки достъпа на Src до местата за фосфорилиране.

Кверцетинът достоверно повишава образуването на лактат (фиг. 3), което може да касае инхибиране на P13K като отрицателен регулатор на гликолизата. Лактоферинът намалява с 18 % образуването на лактат в присъствие на кверцетин, но този ефект не е статистически достоверен (табл. 3). Подобна намеса на лактоферина в ефекта на кверцетина би могла да бъде като резултат от конкуренция в общи сигнални пътища, където двата модулятора имат противоположни ефекти или да се конкурират за електрони, дискутирано за други клетъчни типове, защото и лактоферинът, и кверцетинът са редокс-системи (Maneva et al., 2003; Fiorani & Accorsi, 2005).

Има данни за инхибиращ ефект на кверцетина върху тирозиновото фосфорилиране (Hubbard et al., 2003b) и нашите резултати потвърждават това: кверцетинът понижава фосфорилирането на Тир-467/199 във P13K с 15,32 % (фиг. 7A). Кверцетинът е доказан антикоагулант (Oh et al., 2012; Wright et al., 2013), което съвпада с наблюдавания инхибиращ ефект върху фосфорилирането на P13K (фиг. 13A). Би могло да се предположи, че кверцетинът инхибира, по посока „нагоре“ (upstream), тирозин протеин кинази във P13K-зависим сигнален път, което води до понижено фосфорилиране на Тир-467/199 във P13K (фиг. 7A).

При едновременното присъствие на лактоферин и кверцетин отпада инхибиращия ефект на кверцетина върху на Тир-467/199 във P13K (фиг. 7B). Вероятно лактоферинът и кверцетинът упражняват противоположни ефекти върху едни и същи звена от зависим от P13K сигнален път, където лактоферинът действа като активатор и неутрализира инхибиращия ефект на кверцетина. Ефектът на лактоферина вероятно засяга елементи от P13K сигнален път по посока „нагоре“ (upstream), тъй като е доказано, че този модулатор повишава тирозиновото фосфорилиране на мембранни белтъци (Tanaka et al., 1998; Kobayashi et al., 2005). Такива общи сигнални звена могат да бъдат ензими от Src фамилията кинази, които се инхибират от кверцетина (Maccaglia et al., 2003), но стимулират от лактофеина (Tanaka et al., 1998; Kobayashi et al., 2005).

Оуабаинът е специфичен инхибитор на $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$ (Whittam et al., 1962) и сигнален трансдуктор (Xie & Cai, 2003). Няма данни за клетъчните сигнали, които оуабаинът използва в тромбоцитите. Лактоферинът инхибира достоверно с 23% стимулиращия ефект на оуабаина върху гликолизата (табл. 3), като вероятно се намесва и конкурира за клетъчни сигнали, използвани и от оуабаина. Друга възможност е лактоферинът, като стимулатор на $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATФаза}$ (Maneva et al., 2007) и активатор на $\text{Na}^+\text{/H}^+\text{-антипорт}$ (Sun et al., 1991) да намалява блокиращия ефект на оуабаина върху йонния транспорт в тромбоцитите.

Оуабаинът инхибира с около 17% Тир-467/199 фосфорилирането на P13K (фиг. 7A). Shin et al. (2015) наблюдават инактивиране на Src от оуабаин,

което е в резултат на потискане на фосфорилирането на Тир-416 в Src. Подобно инхибиране на фосфорилирането на Src може да бъде причина за потискане на каскада от фосфорилирания, което в крайна сметка да редуцира фосфорилирането на Тир-467/199 във P13K (фиг. 7А).

В присъствие на лактоферин намалява инхибиращият ефект на оуабаина върху Тир-467/199 фосфорилиране във P13K (фиг. 7Б). Възможно е лактоферинът да конкурира оуабаина за елементи от клетъчни сигнални пътища, което сумарно да се проявява като компенсиране на инхибиторния ефект на оуабаина върху фосфорилирането. Може да се предположи, че ефектът на лактоферина касае неговата способност да стимулира мембранното тирозиново фосфорилиране (Tanaka et al., 1998).

Амилоридът повишава образуването на лактат в тромбоцитите (фиг. 3), тъй като прекъсва изнасянето на H^+ и по този начин увеличава тяхната вътреклетъчна концентрация и възможността за редукция на пирувата.

Амилоридът понижава слабо фосфорилирането на Тир-467/199 във P13K, което показва, че не се намесва в зависимости от P13K-пътища (фиг. 7А).

Лактоферинът няма статистически достоверен ефект върху образуването на лактат в присъствие на амилорид (табл. 3), а също така повлиява несъществено фосфорилирането на Тир-467/199 във P13K в присъствие на амилорид (фиг. 7Б), което показва различни механизми на антикоагулационния ефект на лактофеина и амилорида.

4.3. Ефект на лактоферина, вортманина, кверцетина, оуабаина и амилорида върху количеството на цАМФ в човешки тромбоцити

Вортманинът, кверцетинът, оуабаинът и амилоридът, приложени както самостоятелно, така и в комбинация с лактоферин (100 nM), стимулират достоверно продукцията на цАМФ (от 2,16 до 8,24 пъти) – табл. 7. Единствено при самостоятелното добавяне на лактоферин (100 nM) се наблюдава най-ниското и статистически недостоверно стимулиране на продукцията на цАМФ (1,48 пъти) спрямо контролата.

Вортманинът (50 nM и 1 μ M) стимулира образуването на цАМФ (табл. 7, фиг. 8А); ниската концентрация кверцетин (1,5 μ M) повишава почти 3 пъти продукцията на цАМФ спрямо високата (100 μ M), докато ниските концентрации оуабаин (3 μ M) и амилорид (100 μ M) имат по-слаб стимулиращ ефект спрямо високите (0,5 mM и 1 mM) – табл. 7, фиг. 8А.

Съвместното прилагане на лактоферин (100 nM) към избрани концентрации от останалите модулатори показва допълнително повишаване на продукцията на цАМФ (табл. 7, фиг. 8Б), което говори за синергизъм между лактоферина и всеки един от останалите агенти.

Таблица 7. цАМФ в присъствие на модулатори.

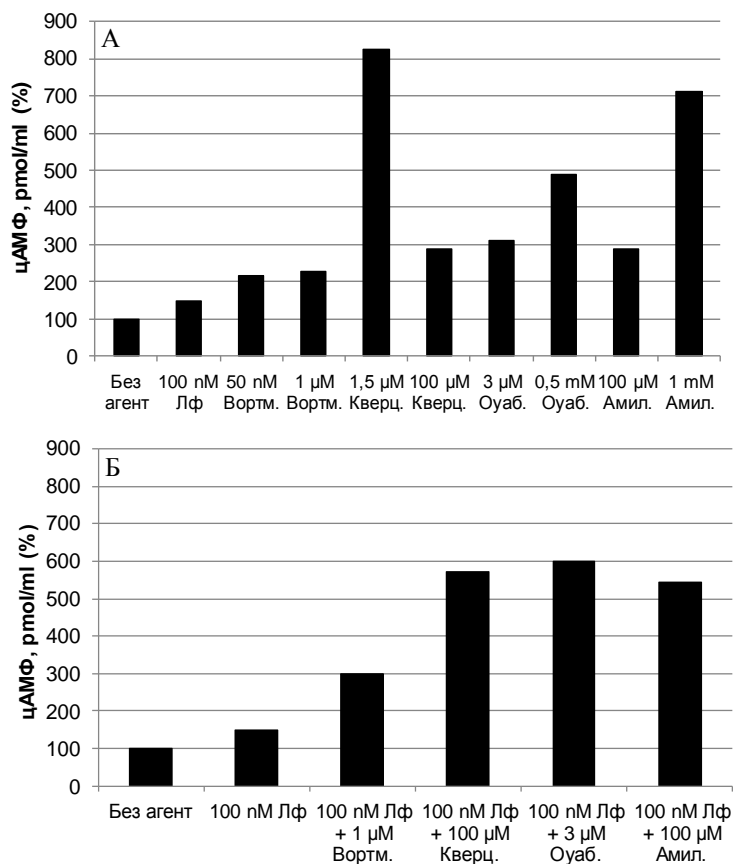
Модулатори (n=8)	цАМФ, pmol/mL ($\bar{X} \pm SD$)	p
Без агент	0,025 ± 0,022	0
Вортманин (50 nM)	0,054 ± 0,016	< 0.01
Вортманин (1 μM)	0,057 ± 0,010	< 0.05
Кверцетин (1,5 μM)	0,206 ± 0,008	< 0.001
Кверцетин (100 μM)	0,072 ± 0,016	< 0.001
Оуабаин (3 μM)	0,078 ± 0,023	< 0.001
Оуабаин (0,5 mM)	0,122 ± 0,003	< 0.001
Амилорид (100 μM)	0,072 ± 0,008	< 0.001
Амилорид (1 mM)	0,178 ± 0,010	< 0.001
Лактоферин (100 nM)	0,037 ± 0,021	> 0.05
Лактоферин (100 nM) + Вортманин (1 μM)	0,075 ± 0,024	< 0.001
Лактоферин (100 nM) + Кверцетин (100 μM)	0,143 ± 0,007	< 0.001
Лактоферин (100 nM) + Оуабаин (3 μM)	0,150 ± 0,003	< 0.001
Лактоферин (100 nM) + Амилорид (100 μM)	0,136 ± 0,010	< 0.001

\bar{X} – средно аритметично; SD – стандартно отклонение; p – ниво на значимост; n – брой повторения.

В литературата съществуват данни за това, че вортманинът, кверцетинът и оуабаинът повишават нивото на цАМФ в различни клетъчни типове, докато за амилорида липсва такава информация. Установено е, че третиране на *Aspergillus parasiticus* D8D3 с вортманин води до повишение в нивото на цАМФ до 25-пъти, като до 10 минути се активира и РКА (Lee et al., 2007).

Кверцетинът значително повишава нивото на цАМФ в колаген-стимулирани тромбоцити (Oh et al., 2012). Освен това, биофлавоноидът промотира растежа на нервни израстъци в N1E-115 клетки като повишава нивото на вътреклетъчния цАМФ (Chen et al., 2015). Производни на кверцетина – кверцетин-3-О-ацетат и кверцетин-3-О-пропионат, също

повишават нивото на цАМФ, като същевременно понижават тромбоцитната агрегация (Wang & Duan, 2014).



Фигура.8. цАМФ (%) в присъствие на модулатори, приложени самостоятелно (А) и в комбинация с лактоферин (Б). Концентрацията на цАМФ в отсъствие на агент приемаме за 100 %. Лф – лактоферин; Вортм. – вортманин; Кверц. – кверцетин; Оуаб. – оуабаин; Амил. – амилорид.

Доказано е, че оуабаинът повишава нивото на цАМФ в астроцити от оптичен нерв при плъх (Mandal et al., 2008), в бъбречен кортекс при куче (Westenfelder et al., 1979), в мозък на плъх (Mørk & Geisler, 1995) и в атриум на заек (Peng et al., 2016).

Нашите резултати показват, че вортманинът, оуабаинът и амилоридът повишават нивото на цАМФ в човешки тромбоцити (табл. 7, фиг. 8А), за което липсват данни в литературата. Освен това, наблюдаваното от нас повишение в нивото на цАМФ в тромбоцитите под действие на кверцетина (табл. 7, фиг. 8А) е в съответствие с наблюдавания от Oh et al. (2012) ефект на този модулатор върху същите тези клетки.

В присъствие на *вортманин* се повишава двойно количеството на образувания цАМФ (табл. 7, фиг. 8А). Това показва, че РІЗК е отрицателен регулатор на аденилат циклазата в тромбоцити, което съвпада с данни от литературата за кръстосани взаимодействия (cross-talk) между цАМФ-сигнализирането и РІЗК/РКВ-пътя (Mei et al., 2002), както и с доказаните противоположни ефекти на цАМФ (инхибитор на тромбоцитната агрегация) и РІЗК (стимулатор на коагулацията) (Smyth et al., 2009).

Оуабаинът е отговорен както за повишаването на свободния цитозолен Ca^{2+} в тромбоцитите (Oshima et al., 1994), събитие водещо до тяхната активация, така и за повишаването на цАМФ в други клетъчни типове (Mandal et al., 2008; Westenfelder et al., 1979; Mørk & Geisler, 1995; Peng et al., 2016). Оуабаинът може да предизвика деполяризация на клетъчната мембрана, опосредствана от повишение в съдържанието на цАМФ и този ефект на оуабаина нараства в присъствие на теофилин (Bakker & Groot, 1984). Обратно, цАМФ регулира активността на оуабаин-чувствителната Na^+/K^+ -АТФаза в SH-SY5Y човешки невробластомни клетки (Inada et al., 1998). Явно съществува взаимна връзка в сигналите на оуабаина и цАМФ, но повишението на цАМФ в присъствие на оуабаин (табл. 7, фиг. 8А) вероятно касае регулационни ефекти, които пряко не засягат тромбоцитната агрегация, тъй като оуабаинът има прокоагулантен ефект, а цАМФ е антикоагулант.

В литературата няма данни за клетъчните сигнали използвани от *амилорида* при инхибиране на тромбоцитната агрегация. Нашите резултати показват, че амилоридът повишава съдържанието на цАМФ в тромбоцитите (табл. 7, фиг. 8А), което съвпада с наблюдавания антикоагулационен ефект на амилорида (Siffert et al., 1986). Би могло да се предположи, че амилоридът активира зависимо от цАМФ-РКА фосфорилиране на серинови остатъци, което води до инхибиране на NHE (Kurashima et al., 1997) и от там до потискане на тромбоцитните функции (Siffert et al., 1986).

KRDS, тетрапептид от човешки лактотрансферин, инхибира тромбин-индуцираната тромбоцитна агрегация, секреция и синтез на тромбоксан, без да засяга активиране на фосфолипаза C_β . KRDS инхибира тирозиновото фосфорилиране на различни субстрати, в частност два 100-105 кДа субстрата, които са свързани с активирането на гликопротеин IIb/IIIa и тромбоцитната агрегация. Отсъствието на тромбоксанов синтез в присъствие

на KRDS може да се дължи на инактивиране на цитозолната фосфолипаза A₂, тъй като последната се нуждае от тирозиново фосфорилиране, за да бъде активна, което обяснява инхибиращото действие на KRDS върху тромбоцитните функции (Lévy-Toledano et al., 1995). Други автори намират, че KRDS и RGDS инхибират 4β-форбол-12-миристат-13-ацетат-индуцираната агрегация и свързване на фибриноген, докато протеините са нормално фосфорилирани, което предполага намеса в сигнали на РКС, водещи до тромбоцитна агрегация (Mazoyer et al., 1990). Няма информация за участие на **лактоферина** в зависимости от цАМФ сигнали в тромбоцитите. Нашите данни показват тенденция цАМФ да се увеличава в присъствие на лактоферин (табл. 7, фиг. 8). Известно е, че казеин киназа 2 фосфорилира по зависим от РКА път лактоферина, което води до понижение в биологичната му активност (Natomi et al., 2000).

Ефект от едновременното въздействие на агенти и лактоферин

– Самостоятелното прилагане на лактоферин повишава нивото на цАМФ (фиг. 8), но ефектът е статистически недостоверен (табл. 7), което показва че лактоферинът няма пряко участие в сигналите на цАМФ. Лактоферинът обаче, допълнително усилва стимулиращото действие на вортманина, кверцетина, оуабаина и амилорида върху образуването на цАМФ (табл. 7, фиг. 8Б). Това вероятно показва синергична намеса на лактоферина в сигнални пътища с участие на РІЗК (вортманин), кверцетина (контрол върху протеин кинази, редокс състоянието на клетката и йонния транспорт), оуабаина и амилорида (механизми на йонен транспорт и фосфорилиране).

Флавоноидите, какъвто е и кверцетинът, са конкурентни инхибитори на много кинази – РІЗК, Akt/ПКВ, тирозин киназа(и), РКС и MAPK (Williams et al., 2004). Към настоящия момент няма данни за това дали лактоферинът и флавоноидите използват общи сигнални пътища. Кверцетинът, като редокс система е част от електрон-транспортна верига, редуцираща екстрацелуларния феррицианид и при физиологични условия е междуклетъчен субстрат за трансплазмената оксидоредуктаза (Fiorani et al., 2002). Съществуват данни за участието на лактоферина в подобна верига (Sun et al., 1991). Редукцията на Fe³⁺-лактоферин до Fe²⁺-лактоферин е задължителен етап от лактоферин-рецепторното взаимодействие (Aisen & Brown, 1975). Флавоноидите може да усилят свързването на лактоферина поради способността си да редуцират желязото (Middleton et al., 2000).

Клетъчните сигнали, използвани от лактоферина и РІЗК имат общи звена, напр. участници в MAPK-пътища (Moreno-Navarrete et al., 2009; Burke & Williams, 2015). Би могло да се предположи, че лактоферинът усилва ефекта на вортманина като конкурент на РІЗК за субстрати на протеин кинази (табл. 7, фиг. 8Б).

Оуабаин-индуцираната ендоцитоза на Na^+/K^+ -АТФаза зависи от активирането на Src киназата, образуването на покрити с клатрин ямки и кавеолин-1 (основен компонент на кавеолите) (Liu, 2005). Лактоферинът пренася сигнали с участие на Src (Такауама, 2012) и би могъл да усилва зависимостта от оуабаина път, водещ до повишение в съдържанието на цАМФ (табл. 7, фиг. 8Б).

4.4. Заключение

Резултатите в настоящия дисертационен труд показват, че лактоферинът, вортманинът, кофеинът, кверцетинът, амилоридът (инхибитори на тромбоцитната агрегация) и оуабаинът (стимулатор на коагулацията) стимулират гликолизата в човешки тромбоцити. Освен това, тези модулатори повлияват фосфорилирането на Сер-16 в Na^+/K^+ -АТФаза, Тре-197 в РКА и Тир-467/199 във РІЗК – ключови аминокиселинни остатъци за активността на съответните ензими. Установяваме още, че лактоферинът, вортманинът, кверцетинът, амилоридът и оуабаинът повишават нивото на цАМФ в тромбоцитите.

В резултати и обсъждане (т. 4) представяме възможните механизми по които използваните от нас модулатори повлияват образуването на лактат, цАМФ и фосфорилирането на Сер-16, Тре-197 и Тир-467/199. Интерпретацията се основава на предположението, че модулаторите използват съществуващите в тромбоцита сигнални пътища, както и на познаването на механизмите на действие (използвани сигнални пътища) от същите тези агенти в други клетъчни типове.

Получените резултати обогатяват познанията върху сигналните пътища използвани в контрола на тромбоцитните функции.

5. ИЗВОДИ

1. Лактоферинът и използваните модулатори стимулират тромбоцитната гликолиза, което показва тясна връзка между биоенергетиката и сигналната трансдукция в тромбоцитите.
2. Опитите със самостоятелно и съвместно прилагане на лактоферин и избраните модулатори показва, че при регулация на гликолизата се използват сигнални пътища с участието на $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$, PI3K и цАМФ-РКА-пътя .
3. Вортманинът, кверцетинът, кофеинът, оуабаинът и амилоридът упражняват регулаторните си ефекти като се намесват в процеси на фосфорилиране на Сер-16 в $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATФаза}$, Тре-197 в РКА и Тир-467/199 във PI3K , което показва намеса в сигналите на $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-помпа}$, цАМФ-РКА-пътя и PI3K-път .
4. Вортманинът, кверцетинът, оуабаинът и амилоридът повишават съдържанието на цАМФ в тромбоцитите, което показва намеса на агентите в сигналите на цАМФ .
5. Лактоферинът, приложен самостоятелно, проявява слаб ефект върху процесите на фосфорилиране на $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATФаза}$, РКА и PI3K , както и върху продукцията на цАМФ .
6. Лактоферинът, приложен заедно с избраните модулатори, увеличава стимулиращия ефект на последните върху фосфорилирането на Сер-16 в Na -помпа и на Тре-197 в РКА, и продукцията на цАМФ , което потвърждава връзката на регулаторните му ефекти със сигналите на $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-помпа}$ и РКА.
7. Лактоферинът неутрализира инхибиращия ефект на използваните модулатори върху фосфорилирането на Тир-467/199 във PI3K , което потвърждава връзката на регулаторните му ефекти със сигналите на PI3K .

6. ПРИНОСИ

А. Фундаментални приноси:

1. За първи път, в условия *in vitro*, е установен стимулиращ ефект на лактоферина, вортманина, кверцетина, кофеина, оуабаина и амилорида върху гликолизата в човешки тромбоцити.
2. Контролът на тромбоцитната гликолиза се извършва по пътища зависими от цАМФ-РКА, Р13К, сигнали на $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-AT}$ Фаза, МАРК, както и в резултат на промяна в редокс-статуса и/или активността на протеин кинази/фосфатази, което е установено в опити с лактоферин, кофеин, вортманин, оуабаин, амилорид и кверцетин.
3. Наблюдавано е, че биологичните ефекти на използваните модулатори на тромбоцитната агрегация са свързани с ковалентна модификация, която обратимо променя степента на фосфорилиране на специфични аминокиселинни остатъци (Сер, Тре и Тир) в регулационни области на $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-AT}$ Фаза, РКА и Р13К.

Б. Научно-приложни приноси:

1. Създаден е методичен подход, обобщаващ опита на различни изследователи, за изолиране на тромбоцити и използването им за изследване на тромбоцитната гликолиза и специфичното фосфорилиране на сигнални молекули.
2. Синергичните ефекти на избраните модулатори и лактоферина могат да бъдат използвани като полезен модел за едновременно използване на агенти, които да усилват и оптимизират биологичните ефекти (стимулация на гликолизата, регулация на тромбоцитната агрегация).

7. НАУЧНИ ТРУДОВЕ И ПУБЛИЧНИ ИЗЯВИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

7.1. Публикации

1. Boyanov K., Maneva A. Modulation of PI3K Tyr-467/199 phosphorylation in human platelets. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences. IF₂₀₁₅ = 0.233 (под печат).
2. Boyanov K., Maneva A. Influence of modulators of protein phosphorylation and ion transport on platelet glycolysis. Trakia Journal of Sciences, Vol. 12, Suppl. 1, 2014, 20-24.
3. Боянов К., Манева А. Лактоферинът като регулатор на тромбоцитната гликолиза. НАУКА И МЛАДОСТ – Сборник научни съобщения от конкурсна сесия 2014, 2014, 315-318.
4. Боянов К., Манева А. Механизми на биологичната активност на лактоферина. Научни трудове на Съюза на учените в България-Пловдив, серия Г. Медицина, Фармация и Дентална медицина, том. XIV, 2013, 96-102.

7.2. Участия в конференции и научни форуми

1. Боянов К., Манева А. Влияние на модулатори върху процеси на фосфорилиране в човешки тромбоцити. Пета национална научна среща по биохимия, 28-30 октомври 2016, гр. Априлци, България.
2. Боянов К., Манева А. Влияние на лактоферина, модулатори на протеиновото фосфорилиране и йонния транспорт върху тромбоцитната гликолиза. Втора национална научна среща по биохимия, 14-16 ноември 2014, с. Кранево, България.
3. Boyanov K., Maneva A. Influence of modulators of protein phosphorylation and ion transport on platelet glycolysis. International scientific conference "1st TRAKIA MEDICAL DAYS", 22-23 May 2014, Stara Zagora, Bulgaria.
4. Боянов К., Манева А. Лактоферинът като регулатор на тромбоцитната гликолиза. Конкурс на МНД "Асклепий" за научно творчество на студенти, докторанти и млади учени – 2014, 10-12 април 2014, Медицински университет – Пловдив.
5. Боянов К., Манева А. Механизми на биологичната активност на лактоферина. Научна сесия „Международна конференция на младите учени“, 13 – 15 юни 2013, Пловдив, България.

Благодарност към:

Научния си ръководител, **проф. Ана Манева, дбн**, за подкрепата, съветите и всеотдайността, с които ми помагаше във всеки един момент от работата по този дисертационен труд.

Колегите от катедра „Химия и биохимия“, за моралната подкрепа и насърчаване по пътя към докторската степен.

Семейството ми, за обичта, търпението и вярата в мен.