

## УЧАСТИЕ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ АМФ-ДЕЗАМИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

А. В. АРУТЮНЯН, Э. А. ГУЛЯН, Г. П. КЕГИЦИЯН, В. С. ОГАНЕСЯН

Тиреоидные гормоны играют важную роль в регуляции мышечной АМФ-дезаминазы, ингибируя активность фермента и существенно изменяя его чувствительность к различным эффекторам (АДФ, БФГК, ГТФ, одновалентные катионы). Наиболее выраженным эффектом обладают 3,3',5-трийод-L-тиронин и его аналоги.

АМФ-дезаминаза (АМФ-аминогидролаза, КФ 3, 5, 4, 6) широко распространена в животном организме и является одним из ключевых ферментов цикла пуриннуклеотидов [15, 27]. В регуляции ее активности в различных тканях участвует ряд низкомолекулярных органических и неорганических соединений [4, 5]. Недавно нами было обнаружено, что наряду с АТФ и одновалентными катионами, эффективными активаторами АМФ-дезаминазы в мозговой ткани являются тиреоидные гормоны, особенно 3,3',5-L-тиронин и некоторые его производные [3].

В связи с этим мы задались целью изучить действие тиреоидных гормонов на активность АМФ-дезаминазы в других, кроме мозга, органах и прежде всего в скелетных мышцах, которые отличаются наиболее высокой активностью этого фермента [15, 17].

*Материал и методика.* Опыты были поставлены на белых крысах массой 180—200 г. Животных декапитировали, извлекали мышцу бедра и гомогенизировали ее в 9 объемах охлажденного К-фосфатного буфера, рН 6,5, содержащего (в мМ): 18-КCl; 5,4-КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> и 3,5-К<sub>2</sub>НРO<sub>4</sub>. Гомогенат центрифугировали 30 мин при 12 000 г на центрифуге К-24 для осаждения ядер и митохондрий. К полученной растворимой фракции добавляли 1 мМ дитиотриэтола (Sigma, США) для стабилизации фермента. В качестве источника фермента использовали 0,2—0,3 мл растворимой фракции, разведенной в соотношении 1:10 0,05 М имидазол-НCl буфером, рН 6,6 (0,12—0,18 мг белка).

Активность АМФ-дезаминазы определяли по приросту аммиака [4] при 30-минутной инкубации при 37° растворимой фракции и выражали в мкмольх/мг белка. Инкубационная среда в объеме 1,5 мл содержала: 5 мкМ/мл АМФ, 50 мкМ имидазол-НCl буфера, рН 6,6 и различные концентрации тиреоидных гормонов и их производных: 3,3',5-трийод-L-тиронин, 3,5-дйод-L-тиронин, 3,3',5-трийодтиреоксусую и 3,3',5-трийодпропиновую кислоты, 3,5-дйод-L-тирозин, 3-монойод-тирозин, L-тиронин (Sigma, США) и L-тироксин (Reanal, ВНР). В отдельных опытах в реакционную среду вносили также 5 мкМ/мл АДФ и 0,5 мг кристаллической дрожжевой гексокиназы, 2 мкМ/мл ГТФ (Sigma, США) и по 10 мкМ/мл KCl или КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>. Белок определяли по методу Лоури и сотр. [16].

*Результаты и обсуждение.* Эксперименты показали, что исследуемые соединения по-разному действуют на активность мышечной АМФ-

дезаминазы (табл. 1). Тироксин ( $T_4$ ) в концентрации 0,1 мкМ/мл не оказывает влияния на активность фермента, тогда как 3,3',5-трийод-L-тиронин ( $T_3$ ) и его производные—3,3',5-трийодтиреоксусная ( $T_3A$ ) и 3,3',5-тиреопропионовая ( $T_3B$ ) кислоты в той же концентрации резко подавляют АМФ-дезаминазную активность (на 49,5, 84,5 и 94,9% соответственно). При снижении концентрации этих соединений до 0,05 мкМ/мл ингибирующий эффект  $T_3A$  и  $T_3B$  уменьшается до 51,6 и 75,7% соответственно, а действие  $T_3$  вовсе не проявляется.

Таблица 1

Действие различных тиреоидных гормонов, их производных и некоторых йодсодержащих соединений на АМФ-дезаминазную активность растворимой фракции мышц крысы, мкМ аммиака/мг белка

| Ингредиенты, мкмоль/мл         |      | Активность фермента |
|--------------------------------|------|---------------------|
| АМФ                            | 5,0  | 8,73±0,24 (20)*     |
| Тироксин                       | 0,1  | 8,5 ±0,55 (7)       |
|                                | 0,05 | 8,34±0,3 (9)        |
| Трийодтиронин                  | 0,1  | 4,46±0,05 (9)       |
| Дийодтиронин                   | 0,1  | 7,4 ±0,63 (8)       |
| Тионин                         | 0,1  | 9,3 ±1,02 (6)       |
| Трийодтиреоксусная кислота     | 0,05 | 4,2 ±0,32 (11)      |
|                                | 0,1  | 1,35±0,04 (8)       |
| Трийодтиреопропионовая кислота | 0,05 | 2,12±0,08 (6)       |
|                                | 0,1  | 0,44±0,03 (6)       |
| Моноидтирозин                  | 0,1  | 8,34±0,13 (6)       |
| Дийодтирозин                   | 0,1  | 7,88±0,13 (7)       |
| I <sub>2</sub>                 | 0,1  | 9,02±0,5 (6)        |
|                                | 0,2  | 8,39±0,07 (6)       |
|                                | 0,5  | 0                   |

\* Здесь и далее в скобках количество опытов.

Из данных табл. 1 видно также, что 3,5-дийод-L-тиронин ( $T_2$ ) и тионин также как 3-йод-L-тирозин (МИТ) и 3,5-дийод-L-тирозин (ДИТ) не влияют на активность мышечной АМФ-дезаминазы.

Полученные данные свидетельствуют о специфичности действия  $T_3$  и его производных на активность АМФ-дезаминазы мышечной ткани, так как тиреоидные соединения с меньшим ( $T_2$ ) или большим ( $T_4$ ) содержанием йода не оказывают ингибирующего действия на активность фермента. Следовательно, в проявлении тормозящего эффекта тиреоидных соединений на активность мышечной АМФ-дезаминазы важное значение имеет количество атомов йода тирониновой части молекулы и структура ее боковой цепи.

Основным путем обмена тиреоидных гормонов в периферических тканях является их дейодирование с образованием активных йодных радикалов. Высокую по сравнению с  $T_4$  биологическую активность  $T_3$  [9] некоторые авторы объясняют его более интенсивным дейодированием [29], и это позволяет предположить, что наблюдаемый нами эффект тиреоидных гормонов на активность мышечной АМФ-дезаминазы может быть связан с действием йодидов, которые подавляют активность

тиоловых ферментов путем связывания SH-групп [11, 28]. Однако последнее в наших экспериментах следует исключить, поскольку молекулярный йод в той концентрации, в которой использовались тиреоидные соединения (0,1 мкМ/мл), не действует на активность мышечной АМФ-деаминазы и ингибирует ее лишь в концентрации 0,5 мкМ (табл. 2).

Подавление активности АМФ-деаминазы в мышечной ткани под влиянием  $T_3$  и его аналогов представляет значительный интерес, так как  $T_3$  может образоваться в периферических тканях [18, 22, 25] и подвергаться в них дальнейшим превращениям с модификацией боковой цепи [5]. Следует отметить, что в скелетных мышцах происходит дейодирование  $T_4$  [10] и образуются уксуснокислые и молочнокислые производные  $T_3$  [26].

Нами были проведены некоторые кинетические исследования процесса ингибирования активности мышечной АМФ-деаминазы под влиянием тиреоидных гормонов. Установлено, что кривая зависимости активности АМФ-деаминазы от концентрации ферментного белка носит сигмоидный характер (рис. 1). В присутствии тиреоидных соединений, особенно  $T_3A$ , степень сигмоидности кривой возрастает.

Кривая зависимости активности АМФ-деаминазы от концентрации субстрата также имеет типичную сигмоидную форму (рис. 2). Получен-

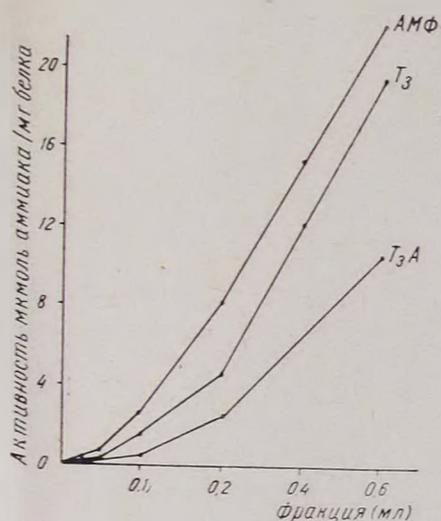


Рис. 1.

Рис. 1 Зависимость ингибирующего эффекта  $T_3$  и  $T_3A$  на АМФ-деаминазную активность от концентрации ферментного белка.

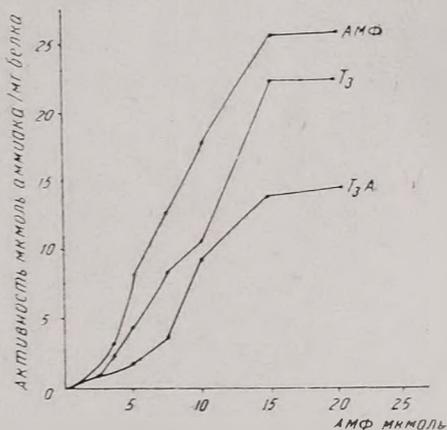


Рис. 2.

Рис. 2 Зависимость ингибирующего эффекта  $T_3$  и  $T_3A$  на АМФ-деаминазную активность от концентрации субстрата.

ная нами кривая характерна для АМФ-деаминазы скелетных мышц, являющейся аллостерическим ферментом [21, 23]. В присутствии тиреоидных гормонов S-образность кривой усиливается, что может свиде-

Таблица 2

Действие различных эффекторов на АМФ-дезампназную активность растворимой фракции мышц крысы в присутствии  $T_3A$ , мкмоль аммиака/мг белка

| Условия опыта   | АМФ       | АДФ       | АТФ       | БФГК      | KCL       | ГТФ                 |                     | Фн          |             | $T_3A$ |      |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------------|---------------------|-------------|-------------|--------|------|
|   |           |           |           |           |           | $2 \cdot 10^{-3} M$ | $5 \cdot 10^{-3} M$ | $10^{-4} M$ | $10^{-5} M$ |        |      |
| Контроль (без предынкубации)<br>+ $T_3A$ ( $10^{-4} M$ )                                    | 11,02±0,6 | 30,67±1,5 | 25,3±1,03 | 22,12±1,4 | 21,93±1,7 | 8,26±0,8            | 7,6±0,4             | 0,66±0,18   | 10,9±0,5    | —      | —    |
|   | 0,66±0,18 | 11,29±0,5 | 12,0±0,7  | 1,35±0,1  | 1,86±0,1  | 3,68±0,3            | 3,5±0,01            | —           | —           | —      | —    |
|   | (10)      | (8)       | (8)       | (8)       | (8)       | (8)                 | (8)                 | (10)        | —           | —      | —    |
| Предынкубация 15 мин без добавок<br>+ $T_3A$ ( $10^{-5} M$ )<br>АДФ ( $5 \cdot 10^{-3} M$ ) | 5,0±0,1   | 7,52±0,08 | —         | 5,68±0,1  | 8,6±0,18  | 8,78±0,22           | 2,98±0,2            | —           | 2,36±0,02   | —      | —    |
|   | 2,05±0,09 | 2,95±0,1  | —         | 2,2±0,21  | 3,68±0,28 | 6,0±0,5             | 1,2±0,1             | —           | —           | —      | —    |
|   | 22,8±0,98 | —         | —         | 24,0±0,21 | 22,5±0,7  | 20,4±0,8            | 21,1±0,6            | 8,73±0,02   | 19,25±0,12  | —      | —    |
|   | (12)      | (9)       | —         | (9)       | (9)       | (11)                | (10)                | (10)        | (10)        | (10)   | (10) |

тествовать об аллостерической природе вызванного ими ингибирования активности фермента.

$T_3A$  и, особенно  $T_3П$ , вызывают заметное ингибирование активности фермента уже в концентрации 0,025 мкмоль, при повышении их концентрации до 0,1 мкмоль степень ингибирования возрастает (рис. 3). При предынкубации растворимой фракции на фоне снижения контрольного уровня активности значительно повышается чувствительность фермента к тиреоидным гормонам, что видно на примере действия  $T_3A$ . В случае предынкубации фермента с этим ингибитором практически полное ингибирование наблюдается при использовании  $T_3A$  в концентрации 0,025 мкмоль.

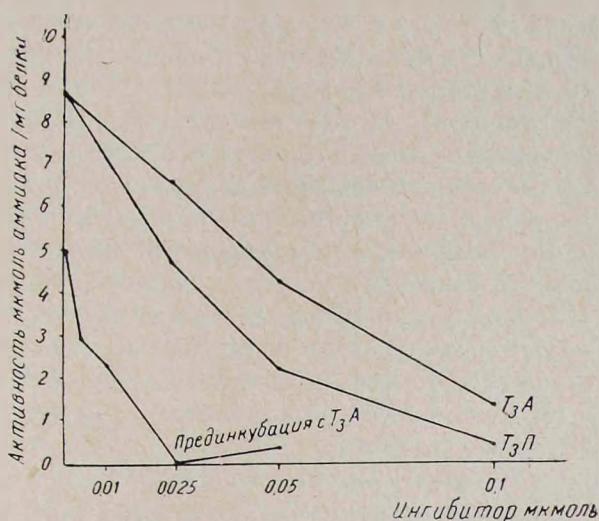


Рис. 3. Зависимость ингибирующего эффекта тиреоидных соединений на АМФ-дезаминазную активность от их концентрации.

Представляло интерес изучение действия тиреоидных гормонов в присутствии других эффекторов мышечной АМФ-дезаминазы. В экспериментах мы использовали  $T_3A$ , ингибирующий эффект которого, как и  $T_3П$ , выражен более заметно по сравнению с  $T_3$ . Из приведенных в табл. 2 данных явствует, что наиболее эффективными активаторами фермента являются адениннуклеотиды—АДФ, АТФ. Несколько менее выражено действие ионов калия и белкового фактора (БФГК), обнаруженного нами ранее в препарате дрожжевой гексокиназы. Примечательно, что  $T_3A$  действует на фермент несравненно сильнее, чем ГТФ и фосфат, относящиеся к числу наиболее изученных ингибиторов мышечной АМФ-дезаминазы [13, 14, 19]. Причем применяемая нами концентрация  $T_3A$  меньше концентрации ГТФ и фосфата соответственно в 20 и 50 раз. Ингибирующий эффект  $T_3A$  ослабевает в присутствии АДФ и АТФ и в некоторой степени—ГТФ. При наличии в среде БФГК и фосфата отмечается сильное ингибирование фермента со стороны  $T_3A$ .

Из представленных данных видно также, что в процессе предынку-

бацци фермент частично инактивируется и его чувствительность к АДФ значительно ослабевает. Активирующее влияние калия при этом более выражено по сравнению с АДФ, а БФГК не оказывает никакого действия на активность фермента. Совершенно по-разному проявляется действие ингибиторов: если ингибирующее влияние фосфата сохраняется, то ГТФ повышает активность фермента более чем на 70%.

При предынкубации фермента с  $T_3A$  его активность снижается в большей степени, чем в отсутствие добавок. При этом значительно инактивированный фермент, утратив чувствительность к большинству эффекторов, активируется со стороны ГТФ и КСЛ. Характерно также, что в условиях предынкубации фермента с  $T_3A$  эффективная концентрация ингибитора равна  $10^{-5}$  М, т. е. на порядок меньше, чем в опытах без нее.

Предынкубация с АДФ приводит к тому, что при последующем добавлении всех эффекторов АМФ-деаминазы, кроме  $T_3A$ , проявляется действие АДФ. Интересно, что  $T_3A$  ингибирует фермент и в этих условиях, хотя АДФ в какой-то мере предохраняет последний от тормозящего действия  $T_3A$ , так как ингибирующая концентрация  $T_3A$  в этом случае, как и в опытах без предынкубации фермента, равна  $10^{-4}$  М.

Известно, что мышечная АМФ-деаминаза является тетрамером, распадающимся под влиянием различных диссоциирующих агентов на идентичные неактивные мономеры [8, 20]. Не исключено, что в условиях наших опытов при предынкубации фермента в отсутствие добавленных эффекторов активность фермента падает вследствие его диссоциации на субъединицы. Наличие в среде аллостерического активатора АДФ во время предынкубации препятствует инактивированию фермента. Однако добавление АДФ к предынкубированному в отсутствие эффекторов ферменту приводит к незначительному повышению его активности, между тем как КСЛ или ГТФ в этих условиях более эффективны.

Данные об активирующем влиянии ГТФ на активность фермента в этих условиях представляют, на наш взгляд, определенный интерес, так как известно, что в различных тканях, в том числе и мышечной, ГТФ обычно ингибирует АМФ-деаминазу. Однако в опытах с гомогенатами скелетных мышц установлено, что ГТФ может оказывать как стимулирующее, так и подавляющее влияние на активность АМФ-деаминазы в зависимости от концентрации субстрата [6].

Активирование АМФ-деаминазы в присутствии низких концентраций субстрата выявлено также в печени [24]. Аналогичные данные были получены в отношении действия ГТФ на АМФ-деаминазную активность эритроцитов кролика [12].

Механизм этого явления не представляется ясным, хотя очевидно, что противоположный эффект ГТФ обусловлен различным конформационным состоянием фермента. В этой связи интересны полученные нами данные о том, что при низких концентрациях ферментного белка ингибирующий эффект ГТФ в отношении отдельных изоферментов АМФ-деаминазы мозга не проявляется, что может быть обусловлено изменением степени агрегации фермента [2].

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что тиреоидные гормоны играют важную роль в регуляции мышечной АМФ-дезаминазы, сильно ингибируя активность фермента и существенным образом изменяя его чувствительность к различным эффекторам. Выше было отмечено, что тиресидные гормоны заметно активируют АМФ-дезаминазу мозговой ткани [3]. Характерно, что в обоих случаях наиболее выраженным эффектом среди всех тиреоидных гормонов обладают  $T_3$  и его аналоги. Результаты отдельной серии исследований свидетельствуют о том, что тиреоидные гормоны не влияют на активность фермента в печени, почках и сердечной мышце (неопубликованные данные).

К числу основных физиологических функций АМФ-дезаминазы относится стабилизация энергетического заряда в клетке путем поддержания оптимального соотношения адениннуклеотидов [7]. Исходя из этого, представляется целесообразным, что в скелетных мышцах, обладающих наиболее высокой по сравнению с другими органами АМФ-дезаминазной активностью, тиреоидные гормоны ингибируют фермент, способствуя накоплению АМФ и тем самым его дальнейшему фосфорилированию. В мозге же, где активность АМФ-дезаминазы в отсутствие добавленных активаторов очень низкая, тиреоидные гормоны активируют фермент, препятствуя сохранению избыточных количеств аденозинфосфатов. Возможно, в этом заключается роль тиреоидных гормонов в осуществлении контроля над энергетическим балансом в мышечной и мозговой тканях посредством регуляции АМФ-дезаминазы.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 30.V 1979 г.

**ԹԻՐԵՈԻԴ ԷՈՐՄՈՆՆԵՐԻ ՄԱՍՆԱԿՑՈՒԹՅԱՆԸ ՄԿԱՆԱՅԻՆ ԷՅՈՒՍՎԱԾՔԻ ԱՄՖ-ԴԵՁԱՄԻՆԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆԸ**

Ա. Վ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Է. Ա. ԳՈՒԼՅԱՆ, Գ. Պ. ԿԵՉԻՇՅԱՆ,  
Վ. Ս. ՕԳԱՆԵՍՅԱՆ

*Մկանային ԱՄՖ-դեզամինազային ակտիվության կարգավորման գործում կարևոր դեր են խաղում թիրեոիդ հորմոնները, որոնք արգելակում են ֆերմենտի ակտիվությունը և էականորեն փոխում նրա զգայունությունը տարբեր էֆեկտորների հանդեպ (ԱԴՖ, ԳՏՖ, հեքսոկինազայի սպիտակուցային ֆակտորը, միավալենտ կատիոններ):*

*Արտահայտված էֆեկտով են օժտված 3,3',5-երեքյոդ-Լ-թիրոնինը և նրա ածանցյալները:*

*Թիրեոիդ հորմոնները չեն ազդում լյարդի, երիկամների և սրտամկանի ԱՄՖ-դեզամինազայի ակտիվության վրա:*

**THE ROLE OF THYREOID HORMONES IN REGULATION OF SKELETAL MUSCLE AMP-DEAMINASE ACTIVITY**

A. V. HAROUTUNIAN, E. E. GULIAN, G. P. KECHISHIAN, V. S. OGANESSIAN

It has been established that thyreoid hormones play an important role in regulation of muscle AMP-deaminase activity. They inhibit enzy-

me activity and considerably change its sensibility to different effector (ADP, GTP, protein factor of hexokinase, monovalent cations).

Among thyreoid hormones tested the most effective are 3, 3', 5-thyreido-L-Thyronine and its analoges.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Арутюнян А. В. Вопросы биохимии мозга, 9, 251, Ереван, 1974.
2. Арутюнян А. В., Ловенштейн Дж. М. Вопросы биохимии мозга, 12, 29, Ереван, 1977.
3. Гулян Э. А., Кегисян Г. П., Арутюнян А. В. и Оганесян В. С. Биолог. ж. Армении 31, 141, 1978.
4. Силакова А. Н., Груш Г. П., Являкова Я. А. Вопросы мед. химии, 8, 538, 1962.
5. Туракулов Я. Х. В кн.: Тиреоидные гормоны, Ташкент, 1972.
6. Brady T. G., Costello J. T. Biochem. Biophys. Acta, 350, 455, 1974.
7. Chapman A. G., Atkinson D. E. J. Biol. Chem., 248, 8309, 1973.
8. Coffee C. J., Kofke W. A. J. Biol. Chem., 250, 6653, 1975.
9. Cross J. R., Pitt-Rivers R. Biochem. J., 15, 53, 645, 1953.
10. Haibach H. Endocrinology, 88, 918, 1971.
11. Hoch T. L. Physiol. Rev., 42, 605, 1962.
12. Kawamura Y. J. Biochemistry (Japan), 72, 21, 1972.
13. Lee Y. P. J. Biol. Chem., 227, 999, 1957.
14. Lee Y. P., Wang M. H. J. Biol. Chem., 243, 226, 1968.
15. Lowenstein J. M. J. Biol. Chem., Physiol. Rev., 52, 382, 1972.
16. Lowry O. H., Rosebrough W. J., Farr A. L., Randall K. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
17. Purzycka I. Acta Biochim. Polon., 9, 83, 1962.
18. Rabinowitz J. L., Herekera E. S. Science, 173, 1242, 1971.
19. Ronca-Testoni S., Ranieri M., Raggi A., Ronca G. Ital. J. Biochem., 15, 262, 1970.
20. Ronca-Testoni S., Ranieri M., Ronca G. Ital. J. Biochem., 19, 262, 1970.
21. Ronca-Testoni S., Ronca G. J. Biol. Chem., 249, 7723, 1974.
22. Schwartz H. L., Surts M. T., Oppenheimere J. S. Clin. Invest., 50, 1124, 1971.
23. Smiley K. L., Suelter C. H. J. Biol. Chem., 242, 1980, 1967.
24. Smith L. D., Kyzer D. E. Biochem. Biophys. Acta. 191, 415, 1963.
25. Sterling R., Brenner M. A., Newman E. S. Science, 169, 1099, 1970.
26. Tata J. R. Proc. Soc. exptl. Biol. Med., 95, 362, 1957.
27. Tornheim K., Lowenstein J. M. J. Biol. Chem., 247, 162, 1972.
28. Varone S., Cosiglo E., Covelli J. Europ. J. Biochem., 13, 305, 1970.
29. Wynn J. Arch. Biochem. Biophys., 126, 880, 1968.
30. Zielke C. L., Suelter C. H. In Enzymes 3rd Ed., 4, 47, 1971.