

УДК 591.553

ОБ УЧАСТИИ ТРИПТИЧЕСКИХ КАРДИОАКТИВНЫХ ФРАГМЕНТОВ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ ГИПОТАЛАМУСА В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФОСФОРИЛАЗЫ И ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО АДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА

СРАПИОНЫАН Р. М., СААКЯН С. А., АБЕЛЯН Ж. Г., ГАЛОЯН А. А.

Изучено влияние кардиоактивных триптических фрагментов специфических белков гипоталамуса—носителей кардиотропных нейрогормонов «К», «С», «Г» на активность фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклического 3', 5' — аденозинмонофосфата, фосфорилазы и на содержание гликогена в тканях белых крыс. Наибольшей ингибирующей способностью в отношении ФДЭ обладает триптический фрагмент белка-носителя нейрогормона «С» (ТФБНС).

Внутривенная инъекция этого фрагмента через 30 мин приводит также к увеличению активности фосфорилазы во всех исследуемых органах.

Однако в сердце происходит более значительное по сравнению с другими органами увеличение активности фермента. Интенсивное увеличение активности фосфорилазы сопровождается заметным уменьшением содержания гликогена. Отмеченные некоторые различия между действием триптических фрагментов на активность фосфорилазы, по-видимому, можно объяснить их структурными особенностями.

Изучение метаболических сдвигов в различных тканях под действием нейрогормона, выделенного из состава низкомолекулярных соединений гипоталамуса и условно названного нейрогормоном «С», позволило выяснить его участие в регуляции гликолитических процессов, особенно в сердечной мышце [1—3]. Эти сдвиги обусловлены участием нейрогормона «С» в регуляции уровня циклических нуклеотидов посредством ингибирования фосфодиэстеразы сАМР [4], что характерно для многих других сосудорасширяющих, психотропных и других соединений, таких, как папаверин, карбохромен, метилксантины и т. д. При этом он не влияет на активность аденилатциклазы (АЦ) в отличие от тиреолиберина, люлиберина, соматостатина, вазопрессина, аденогипофизарных гормонов и некоторых других биологически активных соединений, действие которых связано, главным образом, с активацией АЦ, способствующей накоплению внутриклеточного сАМР. Ингибирующее действие нейрогормона «С» на ФДЭ позволяет предположить участие системы циклических нуклеотидов в реализации органотропного эффекта нейрогормона «С» [5].

Ранее нами было обнаружено наличие в гипоталамусе крупного рогатого скота специфического белка-носителя нейрогормона «С» [6].

Наряду с коронарорасширяющим свойством белок-гормональный комплекс обладал также способностью ингибировать активность ФДЭ сАМР. Последующими исследованиями было показано, что в результате диссоциации этого комплекса белок лишается характерной биологической активности, не восстанавливающейся при воздействии различных денатурирующих агентов.

После трипсинолиза, однако, нам удалось выявить кардиоактивный фрагмент, сходный по многим физико-химическим и биохимическим свойствам, в том числе и способности ингибировать активность ФДЭ с нейрогормоном «С», выделенным из состава низкомолекулярных соединений гипоталамуса. Как показали результаты масс-спектрального анализа, это начало является структурно близким нейрогормону «С» соединением [7].

Это побудило нас изучить в сравнительном аспекте действие кардиоактивного ТфБНС на гликогенолиз и на ФДЭ в мозгу. В настоящей работе мы исследовали, кроме указанного фрагмента, влияние на активность фосфорилазы и фосфодиэстеразы двух других кардиоактивных фрагментов, полученных аналогичным способом из состава белка-носителя нейрогормона «К» (ТфБНК) и белка-носителя нейрогормона «Г» (ТфБНГ).

Материалы и методы

Активность ФДЭ гомогената мозга крыс определяли по количеству гидролизованного субстрата при его инкубации с ферментом по методу Pösch [8], модифицированного применением микрометода, предусматривающего разделение продуктов гидролиза с помощью восходящей тонкослойной хроматографии на пластинках «силуфол UV-254» [9].

В качестве источника ФДЭ использовали супернатант гомогената (2000 g, 20 мин) мозга крыс. Инкубацию проводили при 37° в течение 20 мин в реакционной смеси (10 мкл), содержащей трис-НСI буфер, pH 7,5—100 мМ, $MgCl_2$ —3 мМ; сАМР—50 мкМ, 3H -сАМР—0,2 мкК_и, 5'АМР—1,5 мМ; исследуемые образцы ТфБНС и ТфБНГ—2 мкл или бидистиллат в контрольных пробах, супернатант мозга, содержащий 1—2 мкг белка. Дозировка была установлена эмпирически в соответствии с данными, полученными ранее [10]. После остановки реакции в кипящей водяной бане пробы центрифугировали (3000 g, 15 мин), супернатант подвергали тонкослойной хроматографии на пластинках «силуфол UV-254» в системе: n-бутанол—ацетон—водный аммиак (8:2:1). Далее производили счет радиоактивности продуктов гидролиза сАМР, идентифицированных на жидкостном сцинтилляционном спектрофотометре SH-30 (Франция).

В опытах по определению активности фосфорилазы использовали самцов белых крыс линии Вистар массой 150—180 г, содержащихся на обычном пищевом рационе. Водные растворы препаратов кардиоактивных триптических фрагментов вводили животным в яремную вену в ко-

личестве 0,1 мл на животное, что соответствовало 36 мЕ для ТфБНС и ТфБНГ (за единицу активности принимали такое количество препарата, которое ингибировало 1мЕ ФДЭ сАМР гомогената мозга крысы за 1 мин).

Через 30 мин животных декапитировали, ткани быстро промывали дистиллированной водой на холоду и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в пятикратном объеме ТЭМ-буфера (0,04М трис—0,002М ЭДТА—0,01М меркаптоэтанол), pH 6,8. Активность фосфорилазы (КФ 2.4.1.1.) определяли по Hingworth [11]. При определении фосфорилазной активности гомогенат ткани (0,1 мл) вначале пренкибировали 2 мин при 30° с 0,1 мл 4% водного раствора гликогена и 0,1 мл ТЭМ-буфера, затем добавляли 0,1 мл 4мМ раствора 5'-АМР на 64 мМ глюкозо-1-фосфате. Через 5 мин реакцию останавливали добавлением 1,6 мл охлажденной 5% ТХУ. Количество неорганического фосфата определяли по методу Tayssky [12]. Содержание гликогена в гомогенатах тканей определяли методом Morris [13] через 30 мин после введения исследуемых веществ.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований свидетельствовали о том, что наибольшим ингибирующим эффектом в отношении ФДЭ обладал ТфБНС, степень ингибирования которого составляла 40,4%.

ТфБНГ также выявлял значительное ингибирующее действие (на 38%). Исходя из этих данных, логично было ожидать изменение активности фосфорилазы под действием этих же соединений.

Результаты изменения фосфорилазной активности под действием исследуемых препаратов ТфБНС сведены в табл. 1.

Влияние ТфБНС на фосфорилазную активность тканей
($\mu\text{кА P}_i$ мин/г свежей ткани при 30°)

Таблица 1

Исследуемая ткань	Контроль	Опыт
Мозг	$4,85 \pm 1,7$	$7,1 \pm 1,8$ $p < 0,05$
Сердце	$4,8 \pm 2,0$	$12,9 \pm 2,4$ $0,02 < p < 0,05$
Печень	$2,6 \pm 1,2$	$3,9 \pm 1,4$ $p < 0,02$
Скелетная мышца	$5,9 \pm 3,2$	$14,2 \pm 4,3$ $p < 0,001$
Почки	$2,5 \pm 1,4$	$4,2 \pm 2,05$ $p > 0,05$

Примечание. Данные 12 опытов.

Как видно, внутривенная инъекция ТфБНС через 30 мин приводила к увеличению активности во всех исследуемых органах. Однако в сердечной и скелетной мышцах происходило значительное по сравнению с другими органами увеличение на 170 и 140% соответственно. В

этих же условиях отмечалось повышение активности фосфорилазы мозга, печени и почек лишь на 46, 50 и 68% соответственно.

Предыдущие работы показали аналогичное действие препарата нейrogормона «С», выделенного из состава низкомолекулярных соединений [2]. Полученные данные в экспериментах *in vivo* коррелируют с результатами экспериментов *in vitro* относительно влияния нейrogормона «С» на активность фосфорилазы, выделенной из скелетных мышц кроликов [14]. В этом случае было отмечено увеличение активности фермента с $6,2 \pm 0,1$ до $8,5 \pm 0,3$, т. е. на 38%. При этом авторами было отмечено активирующее действие нейrogормона «С» только в присутствии АМР.

Интенсивное увеличение активности фосфорилазы в сердечной мышце может свидетельствовать об усилении гликогенолиза в исследуемых органах. Подтверждением этого предположения наряду с ранее полученными результатами послужили данные по изменению содержания гликогена в сердце (табл. 2).

Таблица 2

Влияние ТфБНС на содержание гликогена (мг%) в тканях белых крыс

Исследуемая ткань	Контроль	Опыт
Сердце	$211 \pm 9,4$	$156 \pm 28,4$ $p < 0,01$
Скелетная мышца	$253 \pm 10,3$	$353 \pm 15,5$ $p < 0,02$
Печень	$3121 \pm 120,0$	3714 ± 135 $p = 0,5$

Примечание. - Данные 11 опытов.

Оказалось, что под действием ТфБНС содержание гликогена в сердце уменьшалось на 21%. В этих же условиях уровень гликогена в скелетной мышце, однако, увеличивается на 39%. В печени существенных изменений в содержании гликогена не отмечалось.

Поскольку распад и синтез гликогена не идут одновременно и контролируются разными системами [15], то, интерпретируя вышеуказанные данные, трудно в настоящее время сделать какие-либо однозначные выводы.

Для фосфорилазы «а» характерен путь аллостерической регуляции, который состоит в ингибировании фермента глюкозо-6-фосфатом; увеличение концентрации последнего должно приводить в этом случае к уменьшению скорости расщепления гликогена.

Необходимо отметить, что неактивная форма гликогенсинтетазы (D-форма) аллостерически активируется глюкозо-6-фосфатом. Следовательно, если имеет место быстрое повышение содержания метаболита, то это не только ингибирует фосфорилазную реакцию, но также стимулирует синтез гликогена, даже если вся гликогенсинтетаза превращается в неактивную форму. Этим можно частично объяснить повышение содержания гликогена в скелетных мышцах под действием ТфБНС, несмотря на увеличение фосфорилазной активности.

Характерные сдвиги в содержании гликогена в сердечной мышце под влиянием нейрогормона «С» наблюдались также в экспериментах *in vitro*, где выявлено значительное понижение гликогена в сердце, что вполне коррелирует с полученными данными в опытах *in vivo*. Возможность нейрогормона «С», с одной стороны, способствовать поглощению глюкозы, а с другой—ее утилизации путем усиления гликолиза, была отмечена ранее [3].

В свете изложенного коррелирующее с нейрогормоном «С» действие ТфБНС на фосфорилазную активность и содержание гликогена в различных органах наряду с полученными ранее данными [7] может свидетельствовать о сходстве между препаратами нейрогормона «С», полученными из различных источников.

Нами было изучено влияние двух других триптических кардиоактивных фрагментов специфических белков на активность фосфорилазы. При введении ТфБНГ прослеживались характерные для ТфБНС сдвиги в сторону интенсивного увеличения фосфорилазной активности во всех органах (табл. 3). Гораздо более выраженными по сравнению с

Влияние ТфБНГ на фосфорилазную активность тканей
(мкА Р_i мин/г свежей ткани при 30°)

Таблица 3

Исследуемая ткань	Контроль	Опыт
Мозг	4,85±1,7	8,3±3,6
Сердце	4,8±2,0	12,2±4,3
Печень	2,6±1,2	4,0±1,8
Мышца	5,9±3,2	15,2±2,5
Почки	2,5±1,4	4,7±2,1

Примечание. Данные 10 опытов.

ТфБНС были изменения в почках (увеличение на 88%) и мозгу (74%). В скелетной мышце происходило увеличение фосфорилазной активности на 163%, а в печени—на 54%, как и при введении препарата ТфБНС.

Наиболее четкие изменения при введении ТфБНГ были обнаружены в сердечной мышце и мозгу; активность фосфорилазы повышалась в указанных органах на 100% (табл. 4).

Увеличение фосфорилазной активности, хотя и в меньшей степени (на 54%), отмечалось также в скелетной мышце. В аналогичных условиях в печени и почках существенных изменений не было обнаружено.

Резюмируя полученные данные, можно заключить, что триптические кардиоактивные фрагменты, оказывая незначительное влияние на активность фосфорилазы почек и печени, весьма существенно повышают активность этого фермента в мозгу, сердце и скелетной мышце. При

этом каждый из них оказывает преимущественное влияние на активность фермента одного органа. Так, например, ТфБНС и ТфБНГ активируют фосфорилазу сердца и скелетной мышцы на 170 и 163% соответственно, в то время как ТфБНК повышает активность фосфорилазы мозга на 100%.

Таблица 4

Влияние ТфБНК на фосфорилазную активность тканей
(мкА Р_i мин/г свежей ткани при 30°)

Исследуемая ткань	Контроль	Опыт
Мозг	4,85±1,7 p<0,001	9,6±4,5
Сердце	4,8±2,0 p<0,001	9,6±2,7
Печень	2,6±1,2 p=0,5	2,8±0,6
Мышца	5,9±3,2 p<0,01	9,1±3,3
Почки	2,5±1,4 p>0,05	2,8±0,3

Примечание. Данные 12 опытов.

Сопоставляя полученные данные, свидетельствующие о сходном действии кардиоактивных фрагментов на изменение фосфорилазной активности в различных органах, нельзя не отметить и некоторые различия между ними, что можно объяснить, по-видимому, их структурными особенностями.

В настоящее время трудно судить о значении фрагментов белковых носителей в регуляции гликогенолиза в вышеперечисленных органах, так как они были получены трипсинолизом специфических белков гипоталамуса. Но нельзя исключить возможности образования аналогичных по структуре фрагментов в мозгу при протеолитическом распаде этих белков в условиях нормы и патологии. Предпосылкой к подтверждению этого предположения являются данные, свидетельствующие о выявлении кардиоактивных фрагментов при действии неочищенных кислых протеаз мозга на указанные белки.

THE EFFECT OF CARDIOACTIVE TRYPTIC FRAGMENTS OF HYPOTHALAMIC SPECIFIC PROTEINS ON THE ACTIVITY OF PHOSPHORYLASE AND cAMP PHOSPHODIESTERASE

SRAPIONIAN R. M., SAHAKIAN S. A., ABELIAN J. G., GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

The effect of cardioactive tryptic fragments of hypothalamic specific proteins—the carriers of cardioactive neurohormones „K“, „C“ and „G“ on the activity of cAMP phosphodiesterase, phosphorylase and on glycogen content has been studied in rat various organs. cAMP phosphodiesterase is maximally inhibited by tryptic fragment of neurohormone „C“

carrier protein (40.4%). The intravenous injection of this fragment leads to the increase of phosphorylase activity in all organs tested (in 30 min) with maximal value in heart tissue (170%) and is accompanied by decrease of glycogen content (26%). Some differences in the mode of action of various tryptic fragments on phosphorylase activity may be due to their structural peculiarities.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А., Алексанян С. С. ДАН АрмССР, 58, 183—186, 1974.
2. Галоян А. А., Алексанян С. С., Абеян Ж. Г., Бархударян Н. А. ДАН АрмССР, 60, 117—120, 1975.
3. Алексанян С. С., Галоян А. А. Биол. ж. Армении, 30, 84—85, 1977.
4. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Погосян М. А. Вопросы биохимии мозга. Изд-во АН АрмССР, 11, 89—97, 1976.
5. Галоян А. А. Вопросы биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, 13, 9—39, 1978.
6. Галоян А. А., Срапионян Р. М. ДАН АрмССР, 42, 210—213, 1966.
7. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Медведев Ф. М., Галоян А. А. ДАН АрмССР, 70, 182—186, 1980.
8. Pösch G. and Kukovetz W. R. Life Sciences, 10, 133—141, 1971.
9. Бериташвили Д. Р., Кафиани К. А. Вопросы мед. химии, 21, 322—329, 1975.
10. Гурвиц Б. Я. Автореф. канд. дис., Ереван, 1979.
11. Illingworth B., Cori C. T. Biochem. Preparations, 3, 1—9, 1953.
12. Tayssky H. K., Shorr E. J. Biol. Chem., 202, 672—683, 1953.
13. Morris D. E. Science, 107, 254—262, 1948.
14. Парсаданян Г. К., Абеян Ж. Г., Галоян А. А. ДАН АрмССР, 64, 164—167, 1978.
15. Pastan J. Sci. Amer., 227, 97—105, 1972.

Институт биохимии
АН Армянской ССР, Ереван

Поступила 5. XII 1981