

УДК 577.152.3

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА *Bryonia alba* НА
ПРОТЕИНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ И СИНТЕЗ БЕЛКОВ
ГОЛОВНОГО МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫС

АПРИКЯН А. Г., КОЧАРЯН Н. В.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыана НАН Армении, Ереван

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* изучено влияние экстракта *Bryonia alba* на активность протеникиназ и синтез белков головного мозга и печени крыс. Показано стимулирующее действие экстракта на активность как сАМР-зависимых, так и сАМР-независимых протеникиназ, что, по-видимому, указывает на участие в этом процессе различных вторичных мессенджеров.

Установлено, что экстракт существенно увеличивает включение [³⁵S]метионина в ТХУ-нерастворимую фракцию головного мозга крыс. На электрофореграмме субклеточных фракций печени крыс, получавших экстракт, обнаружены определенные изменения белкового спектра. При этом ядерная фракция характеризуется несколько пониженным, а микросомальная фракция—повышенным уровнем экспрессии некоторых белков.

В последнее время в современной науке все большее внимание уделяется поиску и исследованию лекарственных средств растительного происхождения, среди которых большое место занимают тонизирующие и стимулирующие средства. К ним относится, в частности, растение *Bryonia alba*, с успехом применяемое в народной медицине различных стран, характеризуется довольно широким диапазоном терапевтического действия и прошедшее длительную проверку временем [1—3].

Химический состав корней растения *Bryonia alba* представлен такими соединениями, как кукурбитацины и их гликозиды, имеющие структурное сходство с глюкокортикостероидами, ряд жирных кислот, стерны, пентациклические тритерпеновые кислоты, а также тригидроксиоктадекадиеновые кислоты, проявляющие простагландиноподобную активность [4].

Исследования нашей лаборатории по изучению регуляции синаптической активности головного мозга белых крыс показали резко ингибирующее действие экстракта *Bryonia alba* на синаптический захват нейромедиаторных аминокислот, стимулируя вместе с тем процесс их высвобождения из синапсом головного мозга [5]. Нами было показано [6], что это явление сопровождается повышением активности

аденилатциклазы мозга и увеличением внутриклеточного уровня сАМР.

В эукариотических системах действие сАМР опосредуется через сАМР-зависимые протенинкиназы [7], которые играют ключевую роль в регуляции клеточной активности [8—10]. Кроме того, увеличение внутриклеточного пула сАМР приводит к экспрессии ряда метаболически важных ферментов, таких как фосфоенолпируваткарбокениназа [11], тирозинаминотрансфераза [12] и другие [13, 14].

Исходя из вышесказанного, представлялось целесообразным изучение влияния экстракта *Vigna alba* на протенинкиназную активность мозга и спектр синтезированных белков мозга и печени крыс; результаты этих исследований представлены в настоящей работе.

Материалы и методы

Исследования проводили на белых крысах-самцах линии *Wistar* массой 150—200 г. Животных декапитировали, быстро отделенный головной мозг (без мозжечка), освобождали от кровеносных сосудов и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (8 строк при 800 об/мин) в 15 мМ К-фосфатном буфере, рН 7,6, содержащем 0,25 М сахарозы, 20 мМ КСl, 12 мМ MgCl₂ и 2 мМ ЭДТА. Полученный 12%-ный гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и использовали в системе синтеза белка.

Субклеточные фракции печени крыс получали методом дифференциального центрифугирования согласно методу Porcellati и соавт. [15]. Электрофорез осуществляли в ПААГ [16].

Синтез белка. Инкубационная смесь (1 мл) содержала 15 мМ КН₂РO₄, рН 7,6, 0,25 М сахарозы, 20 мМ КСl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ АДР; 2 мМ ЭДТА, 0,02%-ного БСА, 0,188 мг/мл смеси аминокислот, 6 мг белка, 2 мкКи [³⁵S] метионина и различные концентрации экстракта *Vigna alba* (от 10⁻⁶ мг/мл до 10 мг/мл). Используемая смесь L-аминокислот содержала 6,6% аланина, 2,0% аргинина, 4,9% аспарагиновой кислоты, 1,6% аспарагина, 8,8% цистина, 10,9% глутаминовой кислоты, 8,4% глутамина, 5,5% глицина, 2,9% гистидина, 1,5% изолейцина, 5,8% лизина, 11,2% лейцина, 1,7% фенилаланина, 2,1% пролина, 5,9% серина, 4,4% треонина, 3,8% триптофана, 7,5% тирозина и 4,4% валина.

Образцы инкубировали при 32° в течение 40 мин при непрерывном перемешивании в открытых центрифужных пробирках. Реакцию останавливали перенесением их на лед. К пробам добавляли охлажденную ТХУ до конечной концентрации 10% и переносили на фильтры Whatman 3ММ, промывая их еще 15 мл 5% ТХУ. Фильтры сушили при комнатной температуре и радиоактивность измеряли во флаконах с толуольным сцинтиллятором на счетчике СГ-40 («Intertechnique», Франция).

Протенинкиназная активность. Для определения фосфотрансферазной активности мозг (без мозжечка) гомогенизировали в микрогомо-

генизаторе (стекло-стекло), используя 50 мМ НЕРЕС-буфер, рН 7,6, из расчета 2 мл буфера на 0,1 г свежей ткани. Гомогенат центрифугировали на холоду при 10 000 г в течение 5 мин. В полученном супернатанте концентрацию белка доводили буфером гомогенизации до 4 мг/мл и использовали в дальнейшем для определения протенинкиназной активности. Было исследовано три вида протенинкиназной активности: общей, сАМР-независимой (в присутствии 0,5 мг/мл специфического ингибитора сАМР-зависимой протенинкиназы) и сАМР-стимулируемой (в присутствии 10 мкМ сАМР).

Реакцию фосфорилирования [17] проводили с некоторыми модификациями. Инкубационная смесь (80 мкл) содержала 100 мкг белков цитозоля мозга, 50 мМ НЕРЕС-буфер, рН 7,6, 10 мМ $MgCl_2$, 50 мкМ [γ - ^{32}P] АТР, 20 мкг гистона Н1, различные концентрации экстракта *Bryonia alba* в присутствии или отсутствии протенинкиназного ингибитора или сАМР.

После преникубации при 4° в течение 15 мин реакцию фосфорилирования инициировали добавлением 50 мкМ АТР, содержащей 0,5 мкКи [γ - ^{32}P] АТР (> 1000 Ки/ммоль) и смесь инкубировали при 30° в течение 10 мин и останавливали перенесением образцов на лед и затем на фильтры Whatman 3ММ с немедленным погружением в холодный раствор 10%-ной ТХУ, содержащий 2% пирофосфата Na. Фильтры промывали в указанном растворе в течение 30 мин. Аналогичные промывки повторяли трижды, после чего фильтры заливали смесью ацетон-этанол (1:1) на 5 мин, затем чистым ацетоном и высушивали при комнатной температуре, просчитывая радиоактивность во флаконах с толуольным сцинтиллятором. Протенинкиназную активность выражали в пмоль перенесенного на гистон Н1 α -фосфата за 1 мин на мг ферментного белка.

Концентрацию белка определяли по методу Lowry [18].

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано дозозависимое увеличение уровня сАМР мозговой ткани под действием экстракта *Bryonia alba* в присутствии ингибитора ФДЭ циклических нуклеотидов [6]. При этом отмечалось более чем 2-кратное возрастание активности аденилатциклазы. Поскольку эффект сАМР проявляется через действие сАМР-зависимых протенинкиназ [7], логическим продолжением работы являлось исследование протенинкиназной активности мозга в этих условиях. Нами было исследовано три вида протенинкиназной активности: общая нестимулированная, сАМР-независимая (в присутствии специфического ингибитора сАМР-зависимой протенинкиназы) и сАМР-стимулированная (в присутствии сАМР). Результаты этих исследований представлены на рис. 1.

Как видно из рисунка, экстракт *Bryonia alba* повышает активность как сАМР-зависимых, так и сАМР-независимых протенинкиназ. При этом, если экстракт в концентрации 1 и 5 мг/мл повышает актив-

ность сАМР зависимых протеникиназ на 58 и 130% соответственно, то его стимулирующее действие на активность сАМР-независимых протеникиназ более выражено и составляет 94% и 188%, соответственно. Такое сопряженное стимулирующее действие экстракта на сАМР-зависимые и сАМР-независимые протеникиназы связано прежде всего с присутствием в экстракте физиологически активных соединений, как ингибирующих рост опухоли [19], так и обладающих простагландиноподобной активностью [4]. Кроме того, полученные данные указывают на возможное участие в этом процессе различных вторичных мессенджеров, хотя аналогичный эффект был обнаружен и в работе Anderson [20], где была показана двунаправленность действия некоторых физиологически активных соединений.

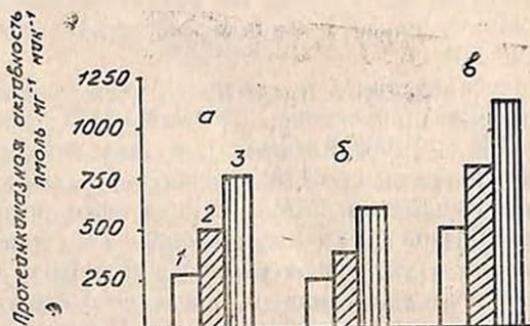


Рис. 1. Влияние экстракта *Bryonia alba* (ЭБА) на протеникиназную активность мозга крыс, а — суммарная протеникиназная активность, б — сАМР-независимая протеникиназная активность, в — сАМР-стимулированная протеникиназная активность. 1 — базальная активность, 2 — стимулированная 1 мг/мл ЭБА, 3 — стимулированная 5 мг/мл ЭБА; $p < 0,01$.

В научной литературе описано довольно много случаев, когда то или иное изменение в протеникиназной активности напрямую коррелировало с экспрессией или изменением уровня экспрессии ряда генов, что фиксировалось обнаружением соответствующих изменений в спектре синтезированных белков [21, 22]. Поэтому представлялось целесообразным изучение влияния экстракта *Bryonia alba* на синтез белков мозга.

Изучение синтеза белка проводилось с использованием гомогената мозга, профильтрованного через 4 слоя марли. Полученные результаты показали, что в присутствии экстракта *Bryonia alba* в концентрации 5 мг/мл наблюдается значительное увеличение синтеза белков мозга. Наблюдаемое увеличение включения [³⁵S]-метионина в белок превышает контрольный уровень примерно в 2 раза. При этом оптимальная концентрация экстракта совпадает с максимально эффективной концентрацией в экспериментах как по влиянию на уровень сАМР и активность аденилатциклазы, так и по стимулирующему действию на протеникиназную активность мозга.

Поскольку синтез белка осуществляется в основном в цитоплазме (микросомы, митохондрии), то было интересно изучить этот эффект в системе, не содержащей ядра. С этой целью ядра осаждали центрифугированием гомогената при 1500g в течение 20 мин и полученный супернатант исследовали в аналогичной системе синтеза белка. Как видно из кривой 3 рис. 2, концентрационная зависимость влияния экстракта *Gyneria alba* на синтез белка дает картину, сходную с кривой зависимости синтеза белка в системе с использованием исходного гомогената. Интересно, что в этом случае максимальное включение [³⁵S] метионина в белок, наблюдаемое при концентрации 5 мг/мл, значительно превышает уровень включения метки в белок, синтезированный в гомогенате мозга (рис. 2). Это объясняется скорее всего возможным присутствием в исходном гомогенате некоторых ядерных факторов, способных транслоцироваться в цитоплазму и либо оказывать модулирующее влияние на процесс трансляции, либо же блокировать действие физиологически активных соединений экстракта.

Обнаруженный эффект по изменению скорости трансляции белков может стать результатом изменения спектра синтезированных белков, что было проверено в экспериментах *in vivo*.

Субклеточные фракции печени крыс, получавших экстракт, были подвергнуты электрофоретическому разделению в ПААГ с использованием ДДС-Na. Результаты этой серии экспериментов на электрофореграмме показали, что в ядерной фракции печени крыс, получавших экстракт, обнаруживаются белки с M_r 50, 30 и 17 кД с уровнем экспрессии ниже контрольного. В то же время в микросомальной фракции видно как белки с повышенным уровнем экспрессии (с M_r 47, 33 и 12 кД), так и белки, в основном низкомолекулярные (с M_r 20, 18 и 15 кД), практически отсутствующие в микросомальной фракции контрольных животных. Планируются исследования по идентификации этих белков и изучению их физико-химических свойств.

Обнаруженный эффект экстракта *Gyneria alba* может являться следствием активации таких процессов, как репликация и/или транскрипция. Ответ на этот вопрос будет дан в последующих экспериментах.

Изменения в уровне транскрипции и трансляции сопутствуют многим естественным и патологическим состояниям организма, таким, например, как старение, психо-неврологические расстройства, нарушения иммунологического статуса [23, 24]. Возможность коррекции этих изменений представляет существенный интерес для современной биологии и медицины.

THE INFLUENCE OF BRYONIA ALBA EXTRACT ON PROTEIN KINASE ACTIVITY AND THE SYNTHESIS OF RAT BRAIN AND LIVER PROTEINS

APRIKIAN A. G., KOCHARIAN N. V.

H. Kh. Buntatian Institute of Biochemistry, Natl. Acad. Sci., of Rep. Armenia, Yerevan

The influence of Bryonia alba extract on protein kinase activity and the synthesis of rat brain and liver proteins are studied in vivo and in vitro. It is shown the stimulating effect of the extract on the activity of as cAMP-dependent as well as cAMP-independent PK which, probably, underlines the participation of different secondary messengers in this process.

It is defined that the extract essentially increases the corporation of ^{35}S metionin in trichloroacetic acid—non soluble fraction of the rat brain. On electrophoregramme of the subcellular fraction of the rat liver, treated by the extract, are discovered certain changes of protein spectrum. The nuclear fraction is characterized by some decrease, and the microsomal fractions are characterised by some increase of expression level of some proteins.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Амիրдовлат Амасиаци. — В кн.: Ненужное для неучей, с. 531—539, Москва, Изд-во АН СССР, 1990.
2. Варданян С. А. — В кн.: Попытки лечения опухолей в средневековой армянской медицине, с. 48—57, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1976.
3. Абу Али Ибн Сина. — В кн.: Канон врачебной науки, кн. 2, с. 619—621, Ташкент, Изд-во ФАН, 1982.
4. Panossian A. G., Avelissian G. M., Mnatsakanian V. A., Batrakov S. G., Vartanian S. A., Gabrielian E. S., Amroyan E. A. *Planta med.*, v. 47, p. 17—25, 1983.
5. Априкян Г. В., Кнарян В. Л., Гекчян К. Г. — В сб.: Тезисы X Всесоюз. конф. по эволюционной физиологии, посвященной памяти академика Л. А. Орбели, с. 69—70, Ленинград, 1990.
6. Априкян А. Г., Коcharян Н. В. — Журнал эксп. клин. медицины, т. 32 (в печати).
Kuo J. F., Greengard P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 76, p. 5096—5096, 1979.
7. Constantinou A. I., Squinto S. P., Jungmann R. A. *Cell*, v. 42, p. 429—437, 1985.
8. Nesterova M. V., Severin E. S. *Life Chem. Rep.*, v. 4, p. 391—465, 1987.
9. Aprikian A. G., Nesterova M. V., Severin E. S. *Biochem. Intern.*, v. 16, p. 601—607, 1988.
10. Iynedjian P. B., Hanson R. W. *J. Biol. Chem.*, v. 252, p. 655—662, 1977.
11. Ruiz-Bravo N., Ernest M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 79, p. 365—368, 1988.
12. Firestone G. L., Heath E. C. *J. Biol. Chem.*, v. 256, p. 1396—1403, 1981.
13. McMorris F. A., Smith T. M., Sprinkle T. G., Auszmann J. M. *J. Neurochem.*, v. 44, p. 1242—1251, 1985.
14. Porcellati G., Arienti G., Pirota M. G., Giorgini D. *J. Neurochem.*, v. 18, p. 1395—1417, 1971.
15. Laemmli U. K. *Nature*, v. 227, p. 680—685, 1970.
16. Нестерова М. В., Глухов А. И., Априкян А. Г., Северин Е. С. *Биохимия*, т. 52, с. 1150—1153, 1987.

18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
19. Konopa J., Matuszkiewicz A., Hrabowska M., Onoszka K. *Arzneimittel-Forsch.*, J. 24, s. 1741—1743, 1-74.
20. Anderson N. G., Maller J. L., Touks N. K., Sturg T. W. *Nature*, v. 343, p. 651—652, 1990.
21. Nesterova M. V., Glukhov A. I., Severin E. S. *Mol. Cell. Biochem.*, v. 49, p. 53—59, 1982.
22. Boney C., Fink D., Schlichter D., Carr K., Wicks W. D. *J. Biol. Chem.*, v. 258, p. 4911—4918, 1983.
23. Cristofalo V. J., Doggett D. L., Brooks-Frederich K. M., Philips P. D. *Exp. Gerontology*, v. 54, p. 367—376, 1989.
24. Dexter D. T., Garayon A., Vidailhet M., Ruberg M., Agid F., Agid Y., Lees A. J., Wells F. R., Jenner P., Mardsen C. D. *J. Neurochem.*, v. 55, p. 122—129, 1990.

Поступила 7, V, 1992.