

УДК 577.17

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН Армянской ССР А. А. Галоян,
Р. О. Карапетян, В. С. Сафарян

**Влияние тиреотропин релизинг гормона (ТРГ) на
окислительное фосфорилирование в митохондриях сердца,
гипоталамуса, почек и печени**

(Представлено 11/III 1974)

В настоящее время хорошо установлено наличие специфических хемомедиаторов в гипоталамусе, стимулирующих выделение (вероятно и синтез) тропных гормонов аденогипофиза.

Эта группа гормонов носит название релизинг гормонов (РГ) (1,2). В лаборатории Р. Гиймена впервые была раскрыта химическая структура тиреотропин релизинг гормона (ТРГ), который оказался пироглютамил-гистидин-проламидом (3,4).

Расшифрованы также молекулярные структуры гормона, стимулирующего выделение лютеинизирующего гормона из аденогипофиза в кровь (ЛРГ) (5) и соматостатина, гормона, ингибирующего выделение гормона роста (7). До настоящего времени принято считать, что РГ поступают и действуют только на аденогипофиз.

Нами накоплены данные, свидетельствующие о том, что релизинг гормоны могут оказывать также прямое влияние на висцеральные функции и даже на периферические эндокринные железы.

В настоящей работе приводятся данные о влиянии ТРГ на окислительное фосфорилирование митохондрий ряда органов как после внутривенного введения, так и при прямом воздействии.

Опыты ставили на 72 кроликах. ТРГ растворяли в физиологическом растворе и 0,5 мл (1 мкг ТРГ на 1 кг веса) вводили в ушную вену (без наркоза). Через 20 мин после введения ТРГ животных обезглавливали и быстро отделяли сердце, печень, почки, гипоталамическую часть мозга и изучали окислительное фосфорилирование в митохондриях этих тканей. Изучали также действие ТРГ на окислительное фосфорилирование митохондрий вышеуказанных органов *in vitro*. В этом случае ТРГ добавляли на каждую пробу в дозе 0,1 мкг. В контрольных опытах вместо ТРГ вводили или добавляли к пробам тот же объем физиологического раствора. Окислительное фосфорилирование митохондрий сердца и других органов изучали методами, описанными Севериным и соавторами (6), Скулачевым (7).

Сердце перфузировали охлажденным 0,15 М КСl. Исследуемые органы измельчали и гомогенизировали в 9 объемах 0,25 М сахарозы с ЭДТА в холодных условиях. рН среды доводили 2н. КОН до 7,4. Инкубацию митохондриальной суспензии проводили в сосудиках Варбурга при 26-30 мин. Газовая фаза-воздух.

Инкубационная среда была следующего состава: для сердца— (1,2 мл) входили (в мкмольх) K_2HPO_4 —20 $MgCl$ —10, КСl—100, 10 мкМ субстрата дыхания (сукцинат или α -кетоглутарат), АТФ—1 (фирмы «Реанал»), глюкоза 150, гексокиназа—2 мг. Митохондрии различных органов изолировали по схеме (табл. 1).

Таблица 1

Схема дифференциального центрифугирования

	Ядра и цитоплазматические обломки		Митохондрии	
	Xg	мин	Xg	мин
Гипоталамус	800	12	15000	15 (10)
Печень	700	10	9000	10 (9)
Сердце	1000	5	8000	7 (8)
Почки	700	10	9000	10 (9)

Митохондрии почек в тех же экспериментальных условиях, что и из печени.

Для мозга, печени и почек— (2,2 мл) входили (в мкмольх) субстрат окисления—50 (сукцинат или α -кетоглутарат), K_2HPO_4 —40, КСl—100, $MgCl_2$ —10, глюкоза—150, АТФ—3 (Реанал) и 0,75 мг кристаллической гексокиназы (Sigma).

По окончании инкубации реакцию останавливали добавлением 6 мл 5% ТХУ на холоду.

Количество эстерифицированного фосфата устанавливали по разности в содержании фосфата в пробах до и после инкубации. Фосфор определяли по методу Лоури и Лопез—1946⁽¹¹⁾. Все полученные данные рассчитаны на 1 мг белка. Белок определяли методом Лоури⁽¹²⁾.

Как видно из табл. 2 при внутривенном введении ТРГ заметно усиливается окислительное фосфорилирование в митохондриях сердца, когда субстратом окисления является сукцинат. При этом поглощение кислорода повышается на 83,76%, а эстерификация фосфата на 142,16%, в результате чего Р/О увеличивается на 29,2% по сравнению с контролем.

При использовании в качестве субстрата окисления α -кетоглутарата интенсивность поглощения кислорода повышается на 96,32%, при этом эстерификация фосфата повышается в меньшей степени (49,08%), вследствие этого Р/О понижается на 23,8%. Известно, что ТРГ в конечном итоге приводит к увеличению количества тироксина в крови, последний разобщает окислительное фосфорилирование⁽¹³⁾. В связи

Таблица 2

Влияние тиреотропного релизинг гормона на окислительное фосфорилирование
в митохондриях сердца кролика (О и Р в мкатамах/мг белка $M \pm m$)

	Н о р м а			Внутривенное введение ТРГ			Прямое влияние ТРГ		
	О	Р	Р/О	О	Р	Р/О	О	Р	Р/О
Субстраты окисления									
Сукцинат	3.14 ± 0.19 (6)	5.17 ± 0.29 (6)	1.68 ± 0.09 (6)	5.77 ± 0.78 (6) $p < 0.02$	12.52 ± 1.76 (6) $p < 0.001$	2.17 ± 0.06 (6) $p < 0.01$	8.91 ± 1.14 (6) $p < 0.001$	20.81 ± 1.73 (6) $p > 0.001$	2.34 ± 0.21 (6) $p < 0.02$
α -кетоглутарат	3.8 ± 0.22 (6)	11.96 ± 0.71 (6)	3.15 ± 0.07 (6)	7.46 ± 0.98 (6) $p < 0.01$	17.83 ± 1.64 (6) $p < 0.02$	2.40 ± 0.18 (6) $p < 0.01$	11.56 ± 1.42 (6) $p < 0.001$	23.52 ± 3.0 (6) $p < 0.01$	2.03 ± 0.27 (6) $p < 0.2$

Таблица 3

Влияние тиреотропного релизинг гормона на окислительное фосфорилирование
в митохондриях гипоталамуса кролика (О и Р в мкатамах/мг белка, $M \pm m$)

	Н о р м а			Внутривенное введение ТРГ			Прямое влияние ТРГ		
	О	Р	Р/О	О	Р	Р/О	О	Р	Р/О
Субстраты окисления									
Сукцинат	2.6 ± 0.19 (6)	4.96 ± 0.41 (6)	1.95 ± 0.09 (6)	4.95 ± 0.7 (6) $p < 0.02$	12.26 ± 2.35 (6) $p < 0.02$	2.47 ± 0.24 (6) $p < 0.05$	5.77 ± 0.79 (6) $p < 0.01$	15.09 ± 1.61 (6) $p < 0.001$	2.8 ± 0.19 (6) $p < 0.001$
α -кетоглутарат	3.35 ± 0.26 (6)	10.68 ± 0.7 (6)	3.19 ± 0.08 (6)	6.98 ± 1.07 (6) $p < 0.02$	21.04 ± 1.83 (6) $p < 0.001$	3.02 ± 0.22 (6) $p < 0.02$	10.21 ± 0.04 (6) $p < 0.001$	29.45 ± 0.87 (6) $p > 0.001$	2.9 ± 0.33 (6) $p < 0.2$

Влияние тиреотропного релизинг гормона на окислительное фосфорилирование в митохондриях почек кролика (O и P в мкатомах/мг белка, $M \pm m$)

	Н о р м а			Внутривенное введение TRГ*			Прямое влияние TRГ		
	O	P	P/O	O	P	P/O	O	P	P/O
Субстраты окисления									
Сукцинат	3.65 ± 0.25 (6)	6.09 ± 0.31 (6)	1.67 ± 0.09 (6)	4.61 ± 0.45 (6) $p < 0.1$	11.12 ± 1.11 (6) $p < 0.001$	2.41 ± 0.1 (6) $p < 0.001$	7.76 ± 0.28 (6) $p < 0.001$	15.31 ± 0.92 (6) $p < 0.001$	1.98 ± 0.13 (6) $p < 0.1$
α -кетоглутарат	4.5 ± 0.3 (6)	13.66 ± 0.61 (6)	3.04 ± 0.13 (6)	6.52 ± 0.11 (6) $p < 0.001$	20.84 ± 1.06 (6) $p > 0.001$	3.2 ± 0.13 (6) $p < 0.2$	11.56 ± 1.15 (6) $p < 0.001$	27.09 ± 1.24 (6) $p > 0.001$	2.35 ± 0.16 (6) $p < 0.02$

Таблица 5

Влияние тиреотропного релизинг гормона на окислительное фосфорилирование в митохондриях печени кролика (O и P в мкатомах $M \pm m$)

	Н о р м а			Внутривенное введение TRГ			Прямое влияние TRГ		
	O	P	P/O	O	P	P/O	O	P	P/O
Субстраты окисления									
Сукцинат	3.74 ± 0.35 (6)	5.74 ± 0.16 (6)	1.54 ± 0.05 (6)	4.26 ± 0.32 (6) $p < 0.2$	9.14 ± 0.38 (6) $p < 0.001$	2.15 ± 0.22 (6) $p < 0.02$	7.53 ± 0.29 (6) $p > 0.001$	14.51 ± 0.45 (6) $p > 0.001$	1.93 ± 0.06 (6) $p < 0.001$
α -кетоглутарат	4.6 ± 0.23 (6)	13.86 ± 0.83 (6)	3.1 ± 0.14 (6)	5.86 ± 0.37 (6) $p > 0.05$	17.33 ± 0.64 (6) $p < 0.02$	3.0 ± 0.21 (6) $p < 0.5$	12.51 ± 0.18 (6) $p > 0.001$	27.56 ± 0.85 (6) $p > 0.001$	2.2 ± 0.05 (6) $p < 0.001$

с этим важно было изучить прямое влияние ТРГ на поглощение кислорода и эстерификацию фосфата в митохондриях вышеуказанных органов. При добавлении ТРГ к митохондриям сердца, когда в качестве субстрата окисления служит сукцинат, количество поглощаемого кислорода возрастает в значительной степени (183,76%), заслуживает внимания более интенсивное сопряжение фосфорилирования (303%) Р/О соответственно повышается на 39,2%. α -кетоглутарат стимулирует поглощение кислорода митохондриями сердца примерно в 3 раза, однако при этом эстерификация фосфата повышается почти в 2 раза. За счет более интенсивного поглощения кислорода Р/О заметно понижается (35,55%), т. е. отмечается такая же закономерность, что и в опытах *in vivo*.

Исследования, проведенные на митохондриях гипоталамуса (табл. 3) показали, что после введения кроликам ТРГ при использовании в качестве субстрата окисления сукцината значительно повышается поглощение кислорода и наряду с этим эстерификация фосфата, в результате чего Р/О заметно повышается.

Такая же закономерность отмечается при прямом воздействии ТРГ на митохондрии гипоталамуса. Что касается α -кетоглутарата, то в контрольных опытах как и следовало ожидать, он заметно повышает поглощение кислорода и особенно эстерификацию фосфата, благодаря чему Р/О составляет $3,19 \pm 0,08$. После внутривенного введения ТРГ способность митохондрий гипоталамуса к поглощению кислорода и эстерификации фосфата возрастает примерно в 2 раза. Величина Р/О почти не меняется. Более разительное повышение поглощения кислорода и эстерификации фосфата (примерно 3 раза) отмечается в опытах при добавлении ТРГ на митохондрии гипоталамуса.

В исследованиях, проведенных на митохондриях почек кролика (табл. 4) отмечается та же самая закономерность, как с сукцинатом, так и с α -кетоглутаратом. И в этих исследованиях сукцинат и α -кетоглутарат при добавлении к митохондриальной фракции более значительно усиливают процессы поглощения кислорода и сопряженного фосфорилирования. И в этих исследованиях α -кетоглутарат повышает поглощение кислорода в большей степени чем эстерификацию фосфата, в результате чего Р/О снижается.

В условиях нашего эксперимента сукцинат и α -кетоглутарат в митохондриях почек и печени (табл. 5) вызывают примерно те же самые изменения поглощения кислорода и эстерификации фосфата. ТРГ как после внутривенного введения, так и при его добавлении к митохондриям печени кролика вызывает примерно те же самые сдвиги в поглощении кислорода, эстерификации фосфата величины Р/О, что и в митохондриях почек.

Подытоживая полученные данные, можно заключить что ТРГ в применяемых нами дозах оказывает однотипное влияние на окислительное фосфорилирование в митохондриях сердца, гипоталамуса, почек и печени как при внутривенном введении, так и при прямом воздействии на митохондрии. Отмечается весьма значительное стиму-

ирование поглощения кислорода и эстерификации фосфата, т. е. окислительного фосфорилирования. Подобное действие ТРГ при прямом воздействии более выражено в митохондриях сердца, затем в гипоталамусе.

Не исключена возможность, что ТРГ являясь низкомолекулярным полипептидом (pGlu—His—Pro—NH₂) может поступать в общую циркуляцию и играть важную роль в регуляции энергетического обмена в различных органах наряду с установленным его участием и в образовании и выделении тиреостимулирующего гормона. Выражаем большую благодарность Р. Гиймену (США), за предоставление нам ТРГ.

Институт биохимии Академии наук Армянской ССР

Հայկական ՍՍՀ ԳԱ քղրակից-անգամ Ա. Ա. ԳԱԼՈՅԱՆ, Ռ. Հ. ԿԱՐԱԳԵՏՅԱՆ, Վ. Ս. ՍԱՅԱՐՅԱՆ

Թիրեոտրոպիկն սիլիզինգ հորմոնի (ԹԽՀ) ազդեցությունն օգսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վրա սրտի, հիպոթալամուսի, երիկամների և լյարդի միտոքոնդրիաներում

Ցույց է տրվել, որ ԹԽՀ-ի ազդեցությունն օգսիդացիոն ֆոսֆորիլացման վրա ճազարների վերը նշված օրգանների միտոքոնդրիաներում *in vivo* և *in vitro* պայմաններում:

ԹԽՀ-ի մասնակցությամբ *in vivo* պայմաններում թթվածնի կլանումը սրտից, հիպոթալամուսից, երիկամներից, և լյարդից անչափված միտոքոնդրիաներում կրկնապատկվում է, նույն չափով էլ ավելանում է անօրգանական ֆոսֆատի էսթերիֆիկացումը:

In vitro փորձերում թթվածնի կլանումը նույնպես ինտենսիվանում է, նախկին պայմաններում սրտի միտոքոնդրիաներում:

ԹԽՀ-ը, բացի իր տիրոջ սինթարտազտումն արյան մեջ խթանող հատկությունից, ունի նաև ուղղակի ազդեցություն ներքին օրգանների էներգետիկ ֆոսֆանակոթյան կանոնավորման պրոցեսներում: Տվյալները վկայում են այն մասին, որ ըստ երևույթին ԹԽՀ-ը նորմալ և ախտաբանական պայմաններում արտազատվում է ուղեղից բնդհանուր արյան շրջանառության մեջ:

ЛИТЕРАТУРА — ԿՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ R. Guittemin, Advances in metabolic disorders, Academic Press, N-Y, Lond., 5, 1 (1971). ² A. Y. Schally et al., Hypophysiotropic Hormones of the hypothalamus (I. Melles, ed.), 208, (1970), Baltimore, Maryland. ³ R. Burgus et al. Nature, 226, 321 (1970). ⁴ R. M. G. Nair et al. Biochemistry, 9, 1103 (1970). ⁵ H. Natsuo et al. Bloch. Biophys. Res. Comm., 45, 822 (1971). ⁶ R. Burgus et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA: 69, 278 (1972) ⁷ R. Guittemin, Вопросы биохимии мозга, Изд. АН Арм. ССР, 8, 141 (1973). ⁸ А. М. Зубовская, Н. О. Степанян, С. Е. Северин, Вопросы мет. химии, 14, 533, (1968). ⁹ В. П. Скулачев, Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М., (1962). ¹⁰ P. Mandel et al. J. Neurochemistry, 1, 126, (1961). ¹¹ O. H. Lowry, J. A. Lopez, J. Biol. Chem., 162, 421 (1946). ¹² O. H. Lowry et al. J. Biol. Chem., 193, 265 (1951) ¹³ F. L. Hoch, Physiol. Rev., 42, 606 (1962).