

УДК 577.15

Л. П. Тер-Татевосян, Л. В. Саркисян, И. Г. Асланян, академик А. А. Галоян

Действие галармина и его производных на активность неорганической пирофосфатазы и щелочной фосфатазы органов белых крыс

(Представлено 8/IX 2003)

Изучение ферментативных процессов углеводно-фосфорного обмена и их регуляция в процессе развития организма имеет важное значение для выявления ряда закономерностей общего биологического характера. Фосфомоноэстеразы по праву можно отнести к числу самых распространенных ферментов, осуществляющих в организме важную физиологическую функцию ввиду участия в биохимических реакциях обмена веществ в процессе фосфорилирования и дефосфорилирования. Динамику становления ферментативной системы трудно понять без учета химических реагентов, в том числе эффекторов биологического катализа - гормонов.

Выделенные А. Галояном и сотр. из нейросекреторных гранул нейрогипофиза быка пролин-богатые полипептиды (ПБП), обладающие выраженными иммуномодулирующими, нейропротекторными свойствами, представляют несомненный интерес для исследования фосфомоноэстераз, которые по сведениям некоторых авторов могут быть вовлечены в патологию ряда нейродегенеративных болезней [1].

В настоящем исследовании использованы полипептиды, состоящие из 10-15 аминокислотных остатков: пептид с 15 аминокислотными остатками - пролин-богатый пептид-1 (ПБП-1) (Ala-Gly-Ala-Pro-Glu-Pro-Ala-Glu-Pro-Ala-Gln-Pro-Gly-Val-Tyr), названный галармином; пептид с 14 остатками - пептид 174 (Ala-Gly-Ala-Pro-Glu-Pro-Ala-Glu-Pro-Ala-Gln-Pro-Gly-Val); пептид с 10 аминокислотными остатками с С-концевым свободным пролином - пептид 173 (Ala-Pro-Glu-Pro-Ala-Gln-Pro-Ala-Gln-Pro).

Цель работы - изучить влияние вышеуказанных пептидов на активность фосфомоноэстеразы 1 - щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) и неорганической пирофосфатазы (КФ 3.6.1.1) различных органов белых крыс в условиях *in vitro*.

Были использованы те концентрации пептидов, которые в условиях *in vivo* оказались эффективными при некоторых патологиях (поражение центральной нервной системы, гемисекции, отравление змеиными ядами и болезни крови). [1].

Опыты были проведены на печени, мозге и почках белых крыс (самцов) весом 100-120 г. Животных декапитировали, на холоду извлекали исследуемые органы и гомогенизировали определенное количество ткани в дистиллированной воде микроизмельчителем типа Уоринга. Активность неорганической пирофосфатазы определяли по методу Геппеля [2]. Реакционная смесь состояла из 0.01 М пирофосфата Na в медуналовом буфере (pH 7.2) и определенного количества гомогената для разных тканей. 1 мл гомогената содержал 30-40 мг свежей ткани. Активность неорганического фосфора определяли фотометрически при длине

волны 630 нм, кювет 0.5 см.

Инкубацию проводили в течение одного часа при температуре 37⁰С. После инкубации приостанавливали реакцию 2 мл 40% трихлоруксусной кислоты и в безбелковом фильтрате определяли неорганический фосфор по методу Лоури и Лопеса [3].

Активность щелочной фосфатазы определяли методом Шлыгина и Михлина [4]. В качестве субстрата использовали пара-нитрофенилфосфат ("Reanal") в концентрации 2·10⁻³М в медуллярном буфере (рН 9.6). Об активности фермента судили по нарастанию количества пара-нитрофенола в течение 30 мин при 30⁰С.

Активность очищенного фермента щелочной фосфатазы из тонких кишок цыплят (фирмы "Reanal") определяли так же, как и активность тканевой щелочной фосфатазы (рН 9.6). Реакцию приостанавливали 1 мл 30% ТХУ, окраску восстанавливали слабой щелочью. Интенсивность окраски фотометрировали при длине волны 420 нм, кювет 0.5 мм.

В первой серии опытов мы исследовали действие галармина и его производных в определенном диапазоне доз на активность неорганической пирофосфатазы в печеночной ткани (табл.1). Как показали полученные результаты, высокие дозы пептидов повышают ферментативную активность в среднем на 50%, низкие - на 15%, т.е. в данной ткани прослеживается четкая корреляция между концентрацией пептида и активностью исследуемого фермента.

В почечной ткани активация неорганической пирофосфатазы гипоталамическими пептидами прослеживается при всех использованных количествах, достигая максимальной величины при воздействии пептида 174 (94%).

Таблица 1

Действие галармина и его производных на активность неорганической пирофосфатазы органов белых крыс ($E = [(мкМР)/г, тк., мин]$), $n = 7$

Орган	Контроль	Галармин		Пептид 173		Пептид 174	
		23 γ	46 γ	23 γ	46 γ	13 γ	26 γ
Мгм Печень	184.5±1.9	206±14.5	283.7±21.2	232±9	238±6	230±11	243±7
		P<0.005	P>0.005	P<0.025	P<0.010	P<0.025	P<0.005
	%	100	111	126	129	124.5	132
Мгм Мозг	192±7.7	123±11.2	123±10	182±10	180±6	149±8	144±7.6
		P<0.005	P<0.005	P<0.050	P<0.050	P<0.025	P<0.025
	%	100	64	94.8	93.75	77.6	75
Мгм Почки	159±17.4	224±14	291±25.7	246±8	300±21	296±24	306±26
		P<0.005	P<0.005	P<0.005	P<0.001	P<0.001	P<0.001
	%	100	141	156	188.7	186	194

Противоположная картина наблюдается в мозговой ткани: галармин в дозах 46 и 23 γ резко ингибирует пирофосфатазную активность (36%). Пептиды 174 несколько слабее подавляют фермент (25%), пептид же 173 при сравнении с контрольными животными не оказывает

воздействия на пирофосфатазную активность.

Таким образом, данные табл.1 показывают, что галармин и его производные являются стимуляторами неорганической пирофосфатазы печеночной и почечной тканей крыс, в то же время для фермента мозговой ткани эти пептиды выступают в роли ингибиторов.

Таблица 2

Действие галармина и его производных на активность щелочной фосфатазы органов белых крыс ($E = [(мкМР)/г,тк.,мин]$), $n = 7$

Орган	Контроль	Галармин		Пептид 173		Пептид 174	
		23 γ	46 γ	13 γ	26 γ	13 γ	26 γ
М±m Печень	130.5±3.8	177.0±4.0	163±2.0	159±4.5	172±1.5	174.6±5.2	180±6.0
		P<0.005	P>0.025	P<0.025	P<0.005	P<0.005	P<0.001
	%	100	135.6	121.8	131.8	133.8	138
М±m	82±2.8	81.2±3.2	80.5±2.0	83±3	87.4±3.5	82±3.5	86.5±4.0
		P<0.050	P<0.050	P<0.010	P<0.005	P<0.005	P<0.005
	%	100	99	101	106	100.7	105.5
М±m	229±6.3	169±4.8	223±6.7	158±7	136.5±7	174±7	140±4.6
		P<0.005	P<0.050	P<0.005	P<0.025	P<0.005	P<0.025
	%	100	73.8	67	59.6	76	61

Во второй серии опытов исследовалось действие тех же полипептидов на щелочную фосфатазу печени, почек и мозга крыс (табл.2). Как видно из таблицы, для печеночной ткани характерна однозначная активация фермента при всех используемых дозах пептида. Концентрационная зависимость каталитической активности щелочной фосфатазы почек от исследуемых пептидов определялась в диапазоне 23–46γ. Все пептиды четко ингибируют фермент во всех концентрациях. Стойкую устойчивость к действию всех использованных доз гипоталамических пептидов проявляет щелочная фосфатаза мозга.

Из литературы известно, что щелочная фосфатаза слизистой тонких кишок некоторых животных обладает высокой ферментативной активностью [5,6]. В этом аспекте интерес представляло воздействие биологически активных веществ на частично очищенный фермент слизистой тонких кишок цыплят для сравнения с ферментом гомогената.

Данные этой серии экспериментов показали (табл.3), что щелочная фосфатаза слизистой кишок сильнее подавлялась малыми дозами пептида, т.е. для частично очищенного фермента ингибирующий эффект действующего вещества находится в обратной зависимости от концентрации, что, вероятно, связано с наличием нативных протекторов в очищенном препарате кишечной щелочной фосфатазы.

Таблица 3

Действие галармина и его производных на активность частично очищенного фермента щелочной фосфатазы из слизистой кишечника цыплят ($E = [(мкМР)/мг \text{ белка, мин}]$), $n = 6$

	Контроль	Галармин		N 173		N 174	
		23 γ	46 γ	13 γ	26 γ	13 γ	26 γ
M±m	397±13.5	299±10	364±14	254±8	264±6.6	264±10	273±7.5
		P<0.005	P>0.50	P<0.0	P<0.005	P<0.010	P<0.010
%	100	75.3	92	64	66.5	66.5	68.8

Приведенные нами данные, касающиеся действия гипоталамических пептидов на активность исследуемых ферментов, показывают, насколько неоднозначно их воздействие. Возникает вопрос, каким механизмом осуществляется их регуляция и какова природа фактора, блокирующего или активирующего ферментативную активность.

Щелочная фосфатаза, выделенная из ряда источников, по утверждению многих авторов, принадлежит к металлоэнзимам. Известно также, что все аминокислоты в той или иной степени могут образовывать с ионами металлов хелатные комплексы, принимая непосредственное участие в образовании комплексов ионов металлов с белками [7]. В молекуле фермента, а именно в его аллостерических и активных участках, под действием полипептидов происходят некоторые структурно-конформационные изменения, в результате чего фермент проявляет различную чувствительность по отношению к регулятору.

Кажущееся парадоксальным повышение активности пиррофосфатазы под влиянием всех трех пептидов в печени и почках зависит, вероятно, от деятельности SH-групп, играющих важную роль как в проявлении активности фермента, так и ее регуляции. SH-группы, соединяясь с пептидами, могут повышать активность фермента по тому же механизму, что и в соединениях с тяжелыми металлами [8]. Возможно, в механизме действия пептидов на ферментативную деятельность существуют и другие пути.

По мнению академика А. Галояна, в одних случаях это может быть С-концевой тирозин ПБП-1, который наряду с серином и гистидином является точкой присоединения аниона фосфата, в других - наличие в пептиде четырех пролиновых остатков, обеспечивающих активацию ферментативной деятельности.

Представленный материал говорит о возможной ферментативной регуляции щелочной фосфатазы и пиррофосфатазы новыми гипоталамическими пептидами, обеспечивающей уровень их функциональной активности.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятына НАН РА

Литература

1. *Galoyan A. Armen.* In: Brain Neurosekretory cytokines, Immune Response and Neuronal Survival. Kluwer Academic Publishers. 2004.
2. *Heppel L. A.* - Methods in Enzymology, 421, New York. 1955. V. 2. P. 570.
3. *Lowry O. H., Lopez J. A.* - J. Biol. Chem. 1946. V. 162. N3. P. 421.
4. *Шлыгин Г. К., Михлин С. Я.* - Вопросы мед. химии. 1955. N1. С. 461.
5. *Simpson R. T., Vallee B. L.* - Ann N. Y. Acad. Sci. 1963. V. 166 N2. P. 670-689.
6. *Адунц Г. Т., Саркисян Л. В.* - Биол. ж. Армении. 1983. Т. 35. N9. С. 769.
7. *Hanson A. W., Applebury M. L., Coleman I. E., Wyckoff, Richards F. M.* - J. Biol. chem. 1970. V. 245. P. 4975.
8. *Адунц Г. Т., Саркисян Л. В.* - Биол. ж. Армении. 1975. Т. 28. N9.

**Լ. Պ. Տեր-Թադևոսյան, Լ. Վ. Սարգսյան, Ի. Հ. Ասլանյան,
ակադեմիկոս Ա. Ա. Գալոյան**

**Գալարմինի և նրա ածանցյալների ազդեցությունը սպիտակ առնետների օրգանների
անօրգանական պիրոֆոսֆատազի և հիմնային ֆոսֆատազի ակտիվության վրա**

Գալարմինի և նրա ածանցյալների ազդեցությունը սպիտակ առնետների ուղեղի, լյարդի և երիկամների հիմնային ֆոսֆատազի ակտիվության վրա *in vitro* կախված է օգտագործված նյութի կոնցենտրացիայից: Մյուս կողմից պիրոֆոսֆատազ ֆերմենտի համար այդ հիպոթալամոսային պեպտիդները ակտիվատորներ են:

Համաձայն ստացված տվյալների, ուղեղից արտազատված սպիտակուցները ակտիվորեն մասնակցում են տարբեր օրգանների ֆոսֆորային փոխանակության գործողություններում: