

УДК 577.15

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

**Влияние галармина и его производных на активность гликогенфосфорилазы а в некоторых тканях белых крыс**

(Представлено 29/XII 2003)

Биологически активные пептиды, выделенные из секреторных гранул нейрогипофиза, образуются из высокомолекулярных белков-предшественников, подвергающихся ряду посттрансляционных модификаций (гликозилированию, фосфорилированию и т.п.). Академиком А. А. Галояном показано, что эти пептидные фракции на препаратах *in vivo* и *in vitro* обладают мощным иммуностимулирующим эффектом [1,2].

В организме иммунная и нервная системы взаимодействуют друг с другом. В здоровом организме имеет место модулирование иммунной реактивности нервами, иннервирующими лимфоидные органы; с другой стороны, медиаторы иммунной системы оказывают влияние на функции мозга. Примером могут служить инфекционные болезни и травматические повреждения ЦНС, аутоиммунные и нейродегенеративные болезни, в частности, болезни Альцгеймера и Паркинсона. Установлено, что в патогенезе вышеуказанных болезней важную роль играют ферменты углеводно-фосфорного обмена, когда нарушаются процессы фосфорилирования-дефосфорилирования белков [3-5].

В настоящее время известно уже целое семейство гипофизарных и гипоталамических гормонов, вовлеченных в регуляцию обмена фосфопротеинов разными механизмами действия [6,7], некоторые из них тесно связаны с каскадом реакций, запускаемых сАМР [8-10]. Регулируя гликолитические процессы фосфорилазы, эти нейропептиды играют ключевую роль в процессе метаболизма углеводов, переводя их из запасной формы в метаболически активную.

Преобразование крахмала и других сходных с ним глюкозосодержащих полисахаридов (гликогена) также катализируется фосфорилазами. Реакция представляет собой фосфоролитическое отщепление глюкозы и образованием глюкозо-1-фосфата. Будучи первым звеном в катаболической цепи реакций фосфорилаза является объектом воздействия разнообразных регуляторных механизмов.

Задачей настоящего исследования было выявить биологический спектр действия пролин-богатых пептидов мозга (пептид с 15 аминокислотными остатками - пролин-богатый пептид-1 (ПБП-1 или галармин), пептид с 14 аминокислотными остатками -N 174 и пептид с 10 аминокислотными остатками с С-концевым свободным пролином -N 173) на активность гликогенфосфорилазы (ГФ) - одного из ключевых ферментов в регуляции гликогенолиза в животных тканях. Учитывая, что активность гликогенфосфорилазы непосредственно связана со статусом ее фосфорилированности, в опытах *in vitro* определялась активная ГФ (ГФ-а), как на уровне гомогената, так и на чистом ферменте.

Опыты проводились на тканях белых крыс линии Висмар массой 100-120 г, а также на чистом ферменте, выделенном из мышц кролика, из расчета 1 мг фосфоорилазы а в 1 мл дистиллированной воды.

Животных декапитировали, ткани быстро промывали дистиллированной водой на холоду и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в пятикратном объеме ТЭМ-буфера (0.04 М трис - 0.002 М ЭДТА - 0.01 М меркаптоэтанол), рН 6.8. Активность фосфоорилазы в обоих случаях (КФ 2.4.1.1) определяли по Иллингворту и Кори [11]. Исследуемый материал предынкубировали 2 мин при 30° С 0.1 мл 4% водного раствора гликогена, 0.1 мл ТЭМ-буфера, 0.1 мл исследуемого пептида и далее для хода реакции добавляли 0.1 мл 64 мМ глюкозо-1-фосфата. Через 5 мин реакцию останавливали 1.6 мл охлажденной 5% ТХУ. Активность фермента определяли по убыли неорганического фосфора в реакционной смеси по методу Таусски и Шора [12].

Амилолитическая и фосфооролитическая активность тканей отдельных органов животных неодинакова. Гликогенфосфоорилазы из разных источников отличаются не только по уровню активности, но и по чувствительности к разным эффекторам, что, по-видимому, связано с особенностями четвертичной структуры фермента, определяющей его тканевую гетерогенность [13]. Поскольку имеющиеся литературные сведения не содержат информации о возможном влиянии пептидов, выделенных из нейросекреторных гранул нейрогипофиза крупного рогатого скота, на гликогенфосфоорилазную активность, нами было изучено воздействие галармина и его производных, взятых в физиологических (и субфизиологических) концентрациях, на активность фермента печени, мышц и мозга белых крыс и очищенном ферменте (таблица). Активность ГФ-а под действием этих биологически активных веществ менялась по-разному.

Влияние галармина и его производных на активность гликогенфосфоорилазы а в некоторых тканях белых крыс,

$$E = \frac{\text{мкМ}}{\text{г тк.} \cdot \text{мин}}$$

| Контроль                    | Галармин         |                 | N 173           |                 | N 174           |                  |
|-----------------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
|                             | 23 γ             | 46 γ            | 13 γ            | 26 γ            | 13 γ            | 26 γ             |
| Печень<br>25.0±0.6<br>% 100 | 16.5±1.0<br>66   | 8.5±2.0<br>34   | 17.0±1.0<br>68  | 13.0±1.0<br>52  | 17.5±0.9<br>30  | 14.5±0.7<br>42   |
| Мышцы<br>18.8±0.8<br>% 100  | 20.7±0.8<br>110  | 23.0±0.5<br>122 | 19.8±0.9<br>105 | 19.8±0.2<br>105 | 19.6±0.5<br>104 | 19.8±0.8<br>105  |
| Мозг<br>13.3±0.9<br>% 100   | 11.6±0.3<br>86.5 | 10.1±0.3<br>76  | 13.3±0.2<br>100 | 11.7±0.2<br>88  | 13.3±0.8<br>100 | 11.6±0.8<br>86.5 |
| P<0.05                      | -                | -               | -               | -               | -               | -                |

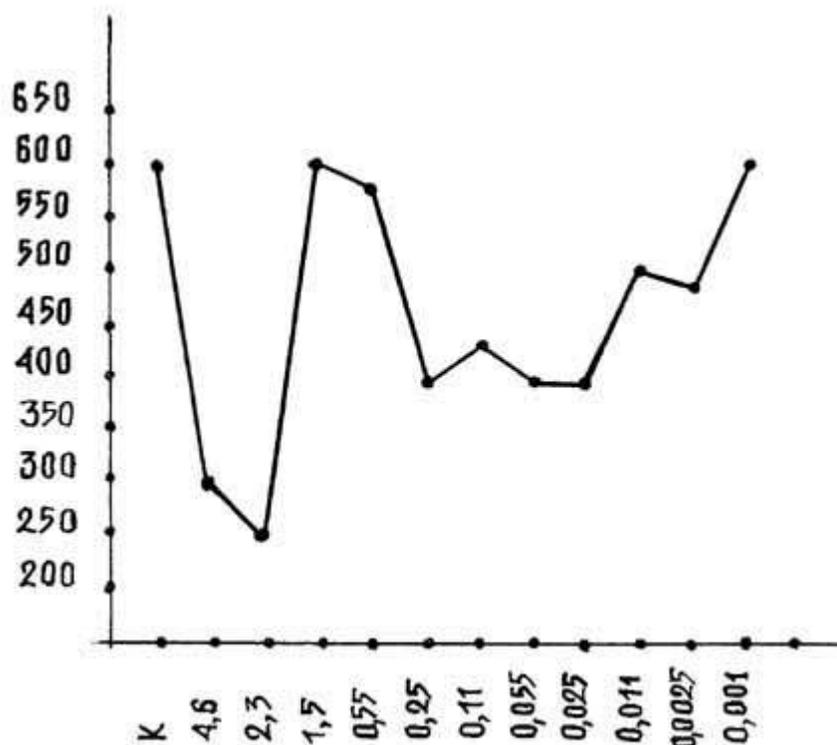
Опыты с добавлением галармина, N 173, N 174 на печеночную ткань показали существенное подавление (66-58%) активности фермента в концентрации 46 γ. Ингибирующий эффект этих пептидов значительно ослабевал при концентрации 26 и 13 γ (соответственно 47 и 30%). Понижение активности ГФ-а говорит о переключении метаболических механизмов на преимущественное депонирование гликогена. Особая роль печени в обмене гликогена

обуславливает наличие определенной специфики регуляторных свойств гликогендефосфорилазы в этом органе. Общеизвестно, что ГФ, являясь фосфопротеином, находится под контролем соответствующих протеинкиназ и фосфопротеинфосфатаз, осуществляющих фосфорилирование и дефосфорилирование. Не исключено, что в этом случае сдвиги в активности фермента происходят вследствие нарушения деятельности вышеуказанных ферментов.

Изменения в активности мозговой фосфорилазы а под действием пептидов менее выражены и характеризуются разнотипностью в картине регулирования. Если ударные дозы пептида 46  $\gamma$  ингибируют активность фермента на 13% и 24%, то при концентрации 23  $\gamma$  активирование ГФ-а невелико (10-6%). В то же время абсолютная величина активности фермента под действием низких концентраций (13  $\gamma$ ) практически не отличается от контрольных величин. По-видимому, в данной ткани эти пептиды осуществляют не только регулируемую, но и протекторную функцию.

Аналогичные исследования по выявлению действия указанных пептидов на ГФ-а были проведены на мышечной ткани белых крыс. Получена следующая картина: галармин и его производные в количестве 46 и 26  $\gamma$  в известной мере активировали фермент мышц, слабый активирующий эффект прослеживался в отношении ГФ-а при добавлении пептидов в количестве 13 и 26  $\gamma$ . Как видим, здесь наблюдается корреляция между активностью фермента и концентрацией пептида. По-видимому, такое активирование фермента связано с изменением статуса его фосфорилированности, т.е. переходом неактивной ГФ в ГФ-а. Накопление ГФ-а должно способствовать усилению деградации гликогена в мышцах животных.

Для полной характеристики воздействия исследуемых полипептидов на фосфорилазную активность наряду с мышечными тканями крыс нами был использован также коммерческий фермент фосфорилазы а, выделенный из мышц кролика (рисунок). Учитывая описанный выше эффект активации, можно было предположить, что подобный эффект мог быть получен и на очищенном ферменте. Однако, как показали экспериментальные данные, галармин и его производные в большинстве случаев выступают ингибиторами этого фермента. В частности, как видно из кривой на рисунке, высокие концентрации подавляют активность вдвое, низкие - на 20-30%, а концентрации 1.5, 0.55 и 0.001  $\gamma$  фактически не действуют на уровень ферментативной активности. Такое расхождение в полученных результатах относительно тканевого и чистого фермента можно объяснить в одном случае прямым влиянием галармина на фермент, в другом, на уровне гомогената, - возможным участием каскадной системы сАМР.



Действие галармина на активность очищенной фосфорилазы α. По оси абсцисс: К - контроль, галармин в γ. По оси ординат: активность фосфорилазы α в Е ( $[(\text{мк моль Р})/(\text{мг белок/мин})]$ );  
Количество опытов - 8.

Экспериментальные данные по действию пептидов на ГФ-а разнородны и с трудом поддаются систематике и обобщению. Весьма вероятно, что в клетке ГФ ее киназа и фосфатаза образуют ансамбль функционально связанных белков, гибко реагирующих на изменения внутренней среды.

Большинство приведенных нами данных свидетельствует о том, что исследуемые пептиды могут служить эффективными регуляторами ГФ, входящей как одно из ведущих звеньев в сложную каскадную систему углеводно-фосфорного обмена.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыя НАН РА

## Литература

1. Галоян А. А., Шахламов В. А., Богданова И. М., Малайцев В. В., Михалева Л. М. - Нейрохимия. 2002. Т. 19. N1. С. 41.
2. Галоян А. А. - Нейрохимия. 2001. Т. 18. N2. С. 83.
3. Arias C., Arrieta Y., Tapra R. - J. Neurochem. 1997. V. 69. Suppl. P. 48.
4. Mumley G., Sonjag E., Nunbhaki-Craig V., Lee G., Blooms G. - J. Neurochem. 1997. V. 69. P. 165.
5. Северин Е. С., Кочеткова М. Н. Роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности. М. Наука. 1985. 286 с.
6. Kevorkian G. A., Kanayan A. S. et al. - Proceedings of the International Conference. Sept. 15-19. 2001. Yerevan-Tsakhadzor.
7. Reil F. J., Levin M. J. M. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci. 1982. V. 79. P. 978.
8. Exton J. H., Cerington A. D. et al. In: Protein Phosphorylation, Book A. (ed. Rosen M., Krebs E.). Cold Spring Harbor Laboratory. 1981. P. 513-528.
9. Галоян А. А., Абелян Ж. Г., Баев В. В., Тер-Татевосян Л. П., Парсаданян Г. К. - Вопр. мед. химии. 1979. Т. 25. N 3. С. 285-288.
10. Sim A. T., R. Collins E., Mudge L. M. - J. Neurochem. 1997. V. 69. P. 163.
11. Illingworth B. I., Cori C. T. - Biochem. Preparations. 1953. V. 3. P. 1-9.
12. Taussky H. H., Shorr E. - J. Biol. Chem. 1953. V. 202. P. 675-685.
13. Dombradi V. - Int. J. Biochem. 1981. V. 13. P. 125-139.

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

**Գալարմինի և նրա ածանցյալների ազդեցությունը սպիտակ առնետների որոշ  
հյուսվածքների գլիկոգենֆոսֆորիլազ a-ի վրա**

Կատարված ուսումնասիրությունների արդյունքում (in vitro) պարզվել է, որ գալարմինը և նրա ածանցյալները ճագարի մկաններից անջատված գլիկոգենֆոսֆորիլազ a-ի ինհիբիտորներ են: Նմանատիպ ազդեցություն նկատվում է նաև սպիտակ առնետների լյարդային հյուսվածքի հոմոգենատում: Գլիկոգենֆոսֆորիլազ a-ն ճնշվում է նաև ուղեղային հյուսվածքի հոմոգենատում՝ գալարմինի բարձր խտության դեպքում: Մկանային հյուսվածքում պատկերը հակառակն է:

Կարելի է ենթադրել, որ ածխաջրածնային-ֆոսֆատային փոխանակման առանցքային ֆերմենտ գլիկոգենֆոսֆորիլազ a-ն կարգավորվում է գալարմինի միջոցով: