

УДК 577.15

Поиск нейрогуморальных путей регуляции активности гликоген-фосфорилазы тканей крыс при участии ПБП-1

Л.П. Тер-Татевосян, Л.Н. Аракелян, Л.А. Ераносян,
С.Г. Чаилян, А.А. Галоян

*Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана
0014, Ереван, ул. П. Севака, 5/1*

Ключевые слова: пролином богатый полипептид, гликогенфосфорилаза, ингибитор аденилатциклазы

Гликоген служит в организме резервом углеводов, из которых в тканях быстро создается глюкозофосфат. Нарушение регуляции распада либо синтеза гликогена путем внесения изменений в аллостерической регуляции или ковалентной модификации гликогенфосфорилазы (ГФ) и гликогенсинтазы (ГС) приводит к нарушению гомеостаза глюкозы в крови.

Скорость синтеза гликогена определяется активностью ГС, расщепление катализируется ГФ. Оба фермента действуют на поверхности нерастворимых частиц гликогена, где они, в зависимости от состояния обмена веществ, могут находиться в активной или неактивной форме.

Регуляция активности ГФ осуществляется путем ковалентной модификации и аллостерических эффекторов [5,10,12], а также согласовывается с активностью ГС [11] для совместной регуляции синтеза и распада гликогена. Ферментная система обмена гликогена находится под гормональным, нейрональным и метаболическим контролем. Положительные эффекторы способствуют деградации гликогена (например, глюкагон, АМФ, адреналин), а отрицательные эффекторы (например, глюкоза, глюкозо-6-фосфат, АТФ) замедляют деградацию. Гормональная регуляция ГФ осуществляется не прямо, а через каскадные системы усиления сигналов, включающих соответствующие протеинкиназы (ПК) и фосфатазы. Внеклеточные мессенджеры передаются в тканях-мишенях посредством каскадных механизмов, включающих серию внутриклеточных сигналов (вторичные, третичные и т.д. мессенджеры). Циклические нуклеотиды относятся ко вторичным мессенджерам и служат активаторами ПК.

Хорошо изучен, например, активируемый цАМФ метаболический путь, составляющий каскад ферментативных активаций, ведущий к распаду гликогена в печени. Активированная протеинкиназа А фосфори-

лирует киназу фосфорилазы (phosphorylase kinase), которая в свою очередь фосфорилирует ГФ.

Таким образом, ГФ входит как составная часть в систему мультиферментного каскада и его структурно-функциональные свойства следует рассматривать с учётом его взаимодействия со всеми компонентами системы [4, 6].

ПБП (пролином богатые полипептиды) были выделены из нейросекреторных гранул гипоталамо-гипофизарной системы крупного рогатого скота [7], обладают широким спектром биологической активности, включая иммуномодулирующие, нейропротекторные свойства, и могут являться регуляторами гуморального и клеточного иммунитета. Полагается, что эти полипептиды взаимодействуют со специфическими клеточными рецепторами.

Цель настоящего исследования – изучить влияние одного из новых цитокинов, открытых Галояном и сотр. : Ala-Glu-Ala-Pro-Glu-Pro-Ala-Glu-Pro-Ala-Glu-Pro-Glu-Val-Тур (ПБП-1), на обмен гликогена на уровне ГФ в печени и селезенке белых крыс.

Данная работа раскрывает интересную связь между действием ПБП-1 (галармин) и аденилатциклазным путем передачи гормонального сигнала. Выявление особенностей пострецепторного действия нейросекреторного цитокина мозга в каскаде регуляции фосфорилазы – наиболее важного фермента деградации гликогена – представляет интерес в плане возможности найти альтернативный путь регуляции исследуемого нами энзима.

Материал и методы

Эксперименты проводились на крысах-самцах массой 200-220 г. Было выделено 3 группы по 6 животных в каждой. Группа 1 – крысы, инъецированные однократно 3мкг ПБП-1; группа 2 – крысы, инъецированные 0,3 мл 10 мкМ 2',5'-дидеоксиаденозина (ДДА) – ингибитора аденилатциклазы; группа 3 – крысы, инъецированные одновременно ПБП-1 и ДДА с 30 мин интервалом в тех же использованных концентрациях; группу контроля составляли интактные крысы. По истечении 24 часов животных декапитировали на холоду, извлекали печень и селезёнку, готовили гомогенат на физ. растворе. В опытах *in vitro* в гомогенатах тканей использованы реагенты в тех же концентрациях, что и *in vivo* (группы 4,5,6). Активность ГФ определяли по Иллингворту и Кори [9]. Гомогенат инкубировали при 32°C с 0,1 мл 4% водного раствора гликогена, 0,1 мл ТЭМ буфера (рН 6,8), 0,1 мл исследуемого гомогената и далее, для продолжения опыта, через 2 мин добавляли в инкубационную смесь 0,1 мл 64 мМ глюкозо-1-фосфат. Через 5 мин реакцию приостанавливали 1,6 мл 5% ТХУ, активность фермента определяли по Таусски

и Шор [13] и выражали в Е (мкМ фосфора / г.тк.мин). Приведенные данные – это средние 5-6 опытов, статистически они достоверны.

Результаты и обсуждение

В работах некоторых авторов есть данные, свидетельствующие о роли циклических нуклеотидов в реализации действия гипоталамических нейрогормонов на метаболизм и функции органов крыс. В частности, обнаружена конкуренция между цАМФ и нейрогормоном С за регуляторную субъединицу ПК [1].

Аденилатциклаза является генератором вторичного внутриклеточного посредника цАМФ. Образовавшийся цАМФ способен через активацию цАМФ-зависимую протеинкиназу передавать гормональный сигнал к различным эффекторным системам вплоть до ГФ. ДДА относится к классическим ингибиторам аденилатциклазы [8]. Его механизм действия основан на блокировании АТФ-связывающего участка циклазы.

В наших экспериментах при использовании *in vivo* широкого диапазона концентраций ДДА выяснилось, что фосфорилазная активность исследуемых тканей относительно к субстрату достаточно чувствительна в присутствии 10 мкМ реагента в инкубационной среде. Как видно из рисунков, через 24 часа после инъекции ингибитора ферментативная активность в гомогенатах печени и селезёнки снижается на 40 и 15% соответственно. Известно, что в каскадную систему регуляции активности ГФ вовлечены адреналин и глюкагон, повышающие уровень внутриклеточного цАМФ. Прямое активирование фермента печени и селезёнки, при введении *in vivo* галармина, отмечается на гомогенатах тканей крыс, что снова согласуется с нашими предыдущими данными [2,3] и говорит об эффективности пептида в отношении фосфорилазы изучаемых тканей (рис. 1,2).

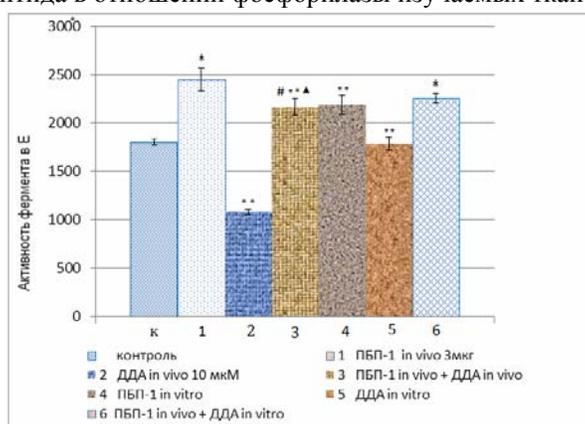


Рис. 1. Активность гликогенфосфорилазы печени крыс: * достоверность по сравнению с контролем, * $p < 0.005$, ** $p < 0.001$; # – достоверность по сравнению с *in vivo* ПБП -1 (1), $p < 0.01$; ▲ – достоверность по сравнению с *in vivo* ДДА (2), $p < 0.001$

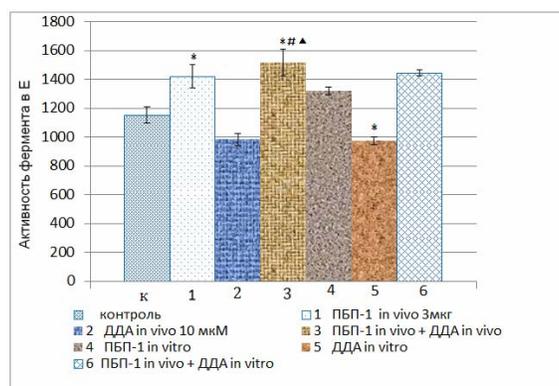


Рис. 2. Активность гликогенфосфорилазы селезенки крыс: * достоверность по сравнению с контролем, * $p < 0.05$; # – достоверность по сравнению с *in vivo* ПБП-1 (1), $p < 0.005$; ▲ – достоверность по сравнению с *in vivo* ДДА (2), $p < 0.01$

На следующем этапе работы была предпринята попытка выяснить возможное участие ПБП -1 в передаче гормонального сигнала на данном участке при наличии в системе ингибитора аденилатциклазы. С этой целью ПБП -1 и ДДА инъецировали крысам однократно в течение суток в перечисленной последовательности с интервалом в 30 мин и оказалось, что протективная эффективность галармина на фоне ингибитора не только сохраняется, но и несколько повышается как в печени, так и селезенке (рис. 1,2). Эти данные говорят о том, что пептид частично снимает ингибирующий эффект ДДА по отношению к аденилатциклазе.

С целью определить, обладает ли пептид прямым воздействием на фермент или его активирующий эффект обусловлен другими механизмами, было исследовано *in vitro* влияние ПБП-1 на ГФ изучаемых органов. Как следует из данных (рис. 1, 2), ПБП-1, инъецированный крысам в использованной концентрации, оказывает более выраженный эффект на фосфоорилазную активность печени и селезенки, нежели таковых в условиях *in vitro*. Активность фермента в этих органах выражается соответственно 2190 Е и 1320 Е. В некоторых случаях результаты *in vivo* не выявляются в опытах *in vitro*, ввиду нарушения естественных условий функционирования фермента, нарушения его посттрансляционного процессинга или внутриклеточного транспорта и т.п.

In vitro исследовалось также действие ингибитора ДДА на фосфоорилазу отдельно и вместе с галармином. На рисунках четко виден спад энзиматической активности печени и селезенки при добавлении в инкубационную смесь 10мкМ ингибитора. В то же время у крыс, заранее инъецированных галармином, в присутствии ДДА *in vitro* регистрируется ферментативная активность в обеих тканях.

Отмеченные сдвиги в активности энзима в целом совпадают с результатами *in vivo*. Большинство приведенных данных свидетельствуют о том что галармин может служить регулятором ГФ активности и что он осуществляет не только активирующую, но и протекторную функцию. Гипотеза исследования заключается в предположении о том, что ПБП -1 оказывает свое глюкозорегулирующее действие через рецептор-опосредованную активацию аденилатциклазы. Впервые показано влияние пролином богатого полипептида как потенциального модулятора циклазных систем при наличии специфического ингибитора аденилатциклазы (2',5'-дидеоксиаденозина).

Возможная роль ПБП-1, как непосредственного участника путей передачи сигнала, дает нам основание сделать предположение о наличии резервных систем в этом известном и важном каскаде. И всё же, биологические механизмы, которыми осуществляется участие галармина в регуляции углеводного обмена, пока недостаточно ясны. В дальнейшем предполагается изучить поэтапно ферменты известного каскада, запускаемые цАМФ и их связь с нейропептидом.

Поступила 18.12.12

Առնետների հյուսվածքներում նեյրոհորմոն PRP-1-ի միջոցով զլիկոզեն ֆոսֆորիլազի ակտիվության կարգավորման ուղիների որոնումը

Լ.Պ. Տեր-Թադևոսյան, Լ.Ն. Առաքելյան, Լ.Ա. Երանոսյան,
Ս.Գ. Չախյան, Ա.Ա. Գալոյան

Ուսումնասիրվել է հիպոթալամիկ նեյրոհորմոն PRP-1-ի (գալարմին) *in vivo* և *in vitro* ազդեցությունը զլիկոզեն ֆոսֆորիլազի ակտիվության վրա առնետի լյարդի եւ փայծաղի հոմոզենատներում: Հաշվի առնելով այն փաստը, որ ֆոսֆորիլազի ակտիվությունը կենդանական հյուսվածքներում պայմանավորված է կասկադային համակարգում գտնվող ֆերմենտների գործունեությամբ (պրոտեինկինազ A, ադենիլատցիկլազ եւ այլն) առանձնակի հետաքրքրություն էր ներկայացնում բացահայտել նեյրոպեպտիդ PRP-1-ի եւ զլիկոզենի քայքայմանը մասնակցող ֆերմենտների միջեւ կապի բնույթը: Այդ նպատակով գիտափորձերում կիրառվել է ադենիլատցիկլազի P տեղամասի ինհիբիտոր 2',5'-դիդեօքսիադենոզինը: Գրանցվել է զլիկոզեն ֆոսֆորիլազի ակտիվության աճ PRP-1-ի ազդեցության հետևանքով լյարդի եւ փայծաղի հոմոզենատներում *in vivo* փորձերում, 36% եւ 23%

համապատասխանաբար: Նեյրոպեպտիդի և ինհիբիտորի համատեղ *in vivo* կիրառման արդյունքում PRP-1-ը մասնակիորեն չեզոքացրել է ինհիբիտորի ազդեցությամբ ադենիլատցիկլազի ակտիվացումը: Գրանցվել է Ֆոսֆորիլազի ակտիվության աճ լյարդում և փայծաղում 20% եւ 31% համապատասխանաբար:

The neurohormonal regulation of glycogen phosphorylase in rat tissues by hypothalamic neurohormone PRP-1

L.P. Ter-Tadevosyan, L.N. Arakelyan, L.A. Yeranossyan, S.G. Chailyan,
A.A. Galoyan

In vivo and *in vitro* the effects of hypothalamic proline rich peptide-1 (galarmin, PRP-1) were investigated on the activity of glycogen phosphorylase (GF) in rat liver and spleen. The activity of tissue phosphorylase depends on and is interconnected with enzymes of cascade system of glycogen breakdown (protein kinase A and adenylatecyclase, etc.).

It was of great interest to study the nature of the relationship between galarmin and enzymes of aforementioned cascade of glycogen breakdown. P-site specific adenylate cyclase inhibitor 2'5'-dideoxyadenosine was used to assess the effect of reducing adenylate cyclase activity on GF activity. It was demonstrated that PRP-1 increased glycogen phosphorylase activity in homogenates of liver and spleen of rats after PRP-1 i.p. administration by 36% and 23%, respectively. After simultaneous administration of neuropeptide with adenylate cyclase inhibitor, the blockade of the adenylate cyclase was partially eliminated by PRP-1. The increased GP activity was registered in liver and spleen by 20% and 31%, respectively.

Литература

1. *Киракосова А.С., Галоян А.А.* Сравнительная оценка действия нового пептидного ингибитора на фосфодиэстеразу с АМР мозга. *Нейрохимия*, 2000, т.17, 1. с. 27-31.
2. *Тер-Тадевосян Л., Ераносян Л., Аракелян Л., Ширинян Э., Галоян А.* Ферменты углеводно-фосфорного обмена в костном мозге и селезёнке при десимпатизации. Эффекты нейропептида PRP-1. *Нейрохимия*, 2009, т. 26, 4, с. 333-336.
3. *Тер-Тадевосян Л., Саркисян Л., Ераносян Л., Галоян А.* Новые данные о наличии нейрогуморальной оси нейросекреторный гипоталамус – костный мозг. Участие N.paraventricularis в регуляции активности углеводно-фосфорного обмена в селезёнке и костном мозге белых крыс. *ДАН РА*, 2011, т. 111, 1, с. 38-43.
4. *Фридрих П.* Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. М., 1986.
5. *Browner M.F., Fletterick R.J.* Phosphorylase: a biological transducer. *Trends Biol. Sci.*, 1992, 17: 66–71.
6. *Dembradi V.* Structural aspects of the catalytic and regulatory function of glycogen phosphorylase. *Int. J. Biochem.*, 1981, 13, p. 125-139.

7. *Galoyan A.A.* Biochemistry of Novel Cardioactive Hormones and Immunomodulators of the Functional System Neurosecretory Hypothalamus – Endocrine Heart. Nauka publishers, Moscow, 1997.
8. *Haertle T.* Metabolism and antihuman immunodeficiency virus-1 activity of 2-nalo-2,3dideoxyadenosine derivatives. Department of Basic and Clinical Research Institute of Scripps Clinic, La Jolla, California. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263: 5870-5.
9. *Illingworth B., Cori G.T.* Biochemistry Preparations. 1953. Vol. 3, p. 1-9.
10. *Johnson N.L.* Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *FAS EB J.*, 1992, 6: 2274–2282,
11. *Madsen N.B.* Glycogen phosphorylase and glycogen synthetase. In: *A Study of Enzymes*, Vol. 2. Edited by Kuby S.A., 1991, RC Press, Boca Raton, FL, U.S.A, p. 139–158.
12. *Newgard C.B., Hwang P.K., Fletterick R.J.* The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1989. 24: 6–99,
13. *Tausschy H.H., Shorr E. J.* *Biol. Chem.*, 1953., Vol. 202, p. 675-685.