

УДК 577.15

Место и роль гипоталамического нейrogормона ПБП-1 в каскаде регуляции активности гликогенфосфорилазы в печени крыс

**Л.П.Тер-Татевосян, Л.Н.Аракелян, В.О.Барсегян,
С.Г.Чаилян**

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

Ключевые слова: гликогенфосфорилаза, гипоталамический нейrogормон
ПБП-1, ингибитор протеинкиназы С

У высших организмов обмен углеводов подвержен сложным механизмам регуляции, в которых участвуют гормоны, метаболиты и кофакторы. В углеводном метаболизме центральное место занимает печень, важнейшей функцией которой является накопление избыточной глюкозы в виде гликогена и её быстрое высвобождение по мере метаболической необходимости (буферная функция). Функция накопления глюкозы в виде гликогена и его распад взаимосогласованы. Согласование процессов обеспечивается тем, что синтез и распад катализируются двумя различными ферментами – гликогенсинтетазой и гликогенфосфорилазой и контролируются независимо. Оба фермента действуют на поверхности нерастворимых частиц гликогена, где они, в зависимости от состояния обмена веществ, могут находиться в активной или неактивной форме. Ферментативная система обмена гликогена находится под гормональным контролем. Гормональная регуляция гликогенфосфорилазы осуществляется не прямо, а через каскадные системы усиления сигналов, включающих соответствующие протеинкиназы (ПК) и протеинфосфатазы (ПФ). Каскадный механизм индуцирует конформационные изменения в эффекторных молекулах и тем самым модулирует их функциональную активность [6]. В последние годы значительно расширились существующие представления о действии гормональных факторов на обмен гликогена, а также выяснились основные механизмы их регуляции [10, 12]. Гипоталамический пролин-богатый пептид (ПБП-1, или Галармин) является новым типом гипоталамических пептидов и, по данным ряда авторов, обладает широким спектром биологической активности [4, 5, 7]. О возможности Галармина принимать участие в процессах регуляции гликогена (через гликогенфосфорилазу) в кроветворных тканях животных (печень, селезёнка, костный мозг) свиде-

тельствуют наши многолетние исследования [3, 14]. Однако механизм, посредством которого нейропептид оказывает регулирующее воздействие на метаболизм гликогена, пока полностью не изучен. В настоящей работе продолжается поиск путей воздействия ПБП-1 на активность основного фермента деградации гликогена – гликогенфосфоорилазу.

Материал и методы

Эксперименты проводились на крысах-самцах массой 200-220 г. Было выделено 4 группы по 6 животных в каждой. Группа 1 – интактные крысы, группа 2 – крысы, инъекцированные 0,3 мл 3 мкМ ПБП-1, группа 3 – крысы, инъекцированные 0,3 мл 10 мкМ ВМІ, группа 4 – крысы инъекцированные однократно ВМІ и ПБП-1 с 30 мин интервалом (в тех же использованных концентрациях). По истечении 24 часов животных декапировали на холоде, извлекали печень, готовили гомогенат на физрастворе. ПБП-1 вводили в/б из расчёта 15 мкг на 100 г ж/в в 5 мл физраствора, контрольной группе вводили идентичный объём физраствора.

Активность гликогенфосфоорилазы (Г.Ф., К.Ф., 2.4.6.1) определяли по Illingworth, Cori [9]. Инкубационная смесь содержала 0,1 мл гомогената исследуемой ткани, 0,1 мл 4% водного раствора гликогена, 0,1 мл ТЭМ буфера (рН 6,8) 0,1 мл ПБП-1, преинкубировали 2 мин при 32°C, затем добавляли в инкубационную смесь 0,1 мл глюкозо-1 фосфат (64 мМ). Через 5 мин реакцию останавливали 1,6 мл 5% ТХУ. Количество отщепившегося фосфора определяли по Taussky, Short [13]. За единицу активности фермента (Е) принимали то его количество, которое катализирует превращение 1 мкМ субстрата в минуту с 1 г ткани.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия достоверности и различий Фишера-Стьюдента. Результаты считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Обратимое фосфоорилирование/дефосфоорилирование ферментов-мишеней, мембранных рецепторов, ионных каналов и других компонентов является ключевым процессом в системе внутриклеточной сигнализации, ответственной за регуляцию различных клеточных функций. Литературные данные, а также результаты наших работ явились основанием в понимании существования взаимосвязи гипоталамических сигнальных молекул и функциональной активности универсальных цАМФ-зависимых протеинфосфатных систем клетки [1, 2]. Основная система передачи сигнала в клетке – это фосфоорилирование белков-мишеней. Этим путём достигается активирование нескольких белковых киназ и фосфатаз, в том числе таких, как цАМФ-зависимая протеинкиназа (ПКА), цГМР-зависимая ПК, киназа

фосфорилазы (ПКС) и ряд др. Активированная ПКС способна фосфорилировать гликогенфосфорилазу, превратив её из неактивной b-формы в активную a-форму, так необходимую для метаболизма гликогена. Расширяя представление о неоспоримой роли нейропептида Галармина в процессе активации фосфорилазы в настоящем исследовании делается попытка выявить механизм регуляции внутриклеточного каскада, по которому идёт активация гликогенфосфорилазы. В этом плане для нас интерес представляет одна из составляющих системы – ПКС. Активация ПКС, как известно, происходит в основном гормональным путём через аденилатциклазную систему [8, 11]. Фермент способен активироваться также с помощью ионов Са через кальмодулин. Существует и метаболический контроль активности киназы фосфорилазы. С учётом всех существующих сторон, решение данного вопроса возможно путём блокирования ПКС с последующей оценкой ферментативной активности гликогенфосфорилазы. ВМІ – ингибитор ПКС, блокируя активный участок фермента, не даёт возможность субстрату взаимодействовать с соответствующими рецепторами, тем самым замедляет процесс фосфорилиции. Активность гликогенфосфорилазы в данном случае ниже активности контрольных крыс (рисунков). Противоположный характер изменения активности фосфорилазы

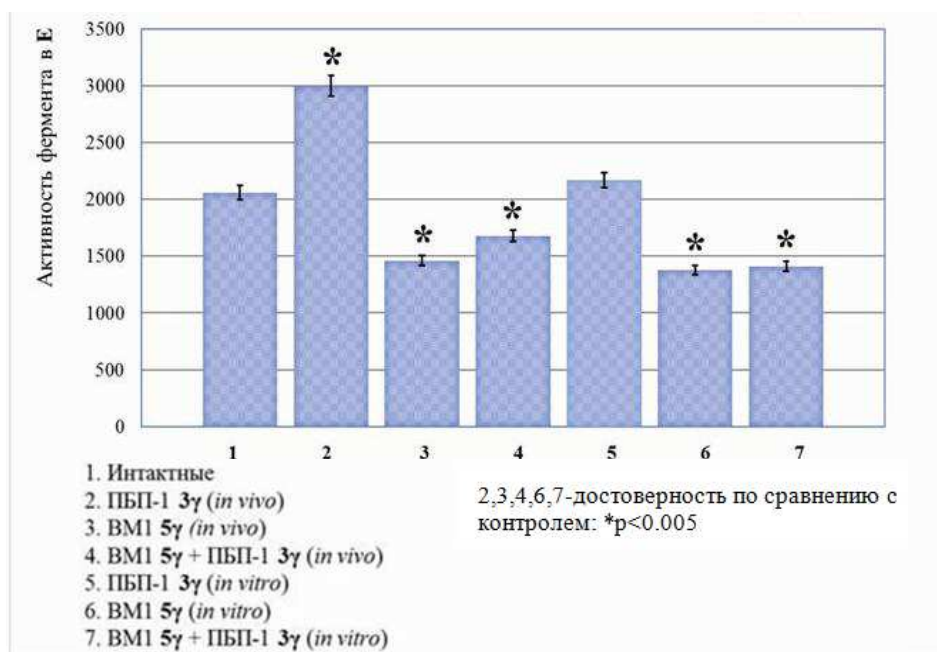


Рис. Активность гликогенфосфорилазы печени крыс в Е $\left(\frac{\text{мкМоль}}{\text{г. тк. мин}} \right)$

выявляется при инъекции крысам 3 γ нейrogормона. Высокая активация фермента характерна для подобного состояния, показатели этой группы

крыс совпадают с нашими предыдущими данными [3, 14] и наглядно отображены на нашем рисунке. Несколько необычно на этом фоне выглядят показатели ферментативной активности печени крыс, где ингибитор и пептид вводятся совместно (с 30-минутным интервалом). В таком варианте Галармин не обладает эффектом активации и основное проявление подобного состояния – это ослабление гликогенфосфорилазы. Аналогичная картина наблюдается и в опытах *in vitro*, когда в инкубационную смесь добавляется равнозначное с условиями *in vivo* количество используемых ингредиентов (рисунок).

Анализ приведенных данных позволяет заключить, что нейропептид Галармин, как активатор гликогенфосфорилазы, прямого воздействия на гликогенфосфорилазу не оказывает, по-видимому, в силу отсутствия на мишени необходимых ему рецепторов. Второе – процессы поступившего от ПБП-1 сигнала не способны обеспечить активацию фермента (фосфорилазы) в отсутствие одного из ключевых участков каскада – киназы фосфорилазы, отвечающей непосредственно за гликогенфосфорилазу и играющую решающую роль в реализации биологической активности вторичных мессенджеров. Другой путь переноса информации от гормона ПБП-1 на соответствующий рецептор, когда происходит фосфорилирование белка-мишени, безусловно, существует и он, по всей вероятности, связан со вторичными или третичными мессенджерами системы. Описанные выше данные в совокупности не дают полного ответа на поставленный вопрос, в то же время никак не отрицают истинных возможностей Галармина модифицировать каталитические свойства активных центров ферментов данного каскада.

Полученные результаты направляют нас на поиск других подходов, с привлечением дополнительных воздействий и более глубокого биохимического анализа этой сложной системы гликогенного обмена.

Поступила 18.12.17

Հիպոթալամիկ նեյրոհորմոն ՊՀՊ-1-ի դերը և տեղը առնետի յարդի գլիկոգենֆոսֆորիլազի ակտիվության կարգավորման կասկադում

**Լ.Պ.Տեր-Թադևոսյան, Լ.Ն.Առաքելյան, Վ.Հ.Բարսեղյան,
Ս.Գ.Զախյան**

Աշխատանքում պարզաբանված է հիպոթալամիկ նեյրոհորմոն ՊՀՊ-1-ի (Գալարմին) ազդեցության մեխանիզմը գլիկոգենի փոխանակության մեջ առնետի յարդի հոմոգոնատում: Փորձերում, օգտա-

գործելով BMI-ին (պրոտեինկինազ C-ի արգելակիչը), հնարավոր դարձավ փաստարկել ուղիղ կապի բացակայությունը ՊՀՊ-1-ի և գլիկոգենֆոսֆորիլազի միջև: Ստացված արդյունքները վկայում են, որ ֆերմենտի վերջնական հորմոնալ կարգավորումը, հավանաբար, կատարվում է երկրորդային մեսենջերների համակարգի միջոցով՝ համակարգում ակտիվ ֆոսֆորիլազկինազի ներկայությամբ:

The place and role of neurohormone PRP-1 in the cascade of the regulation of glycogen phosphorylase in rat liver

**L.P.Ter-Tatevosyan, L.N.Arakelyan, V.H.Barseganyan,
S.G.Chailyan**

The mechanism of hypothalamic neurohormone PRP-1 (Galarmin) effect on glycogen metabolism in rat liver homogenates has been studied. The usage of BMI, a protein kinase C inhibitor, suggested that PRP-1 does not directly affect the glycogen phosphorylase activity. Our data showed that the hormonal regulation of this end point enzyme of glycogen degradation might occur through the system of the secondary messengers in the presence of active phosphorylase kinase.

Литература

1. Тер-Татевосян Л.П., Ераносян Л.А., Аракелян Л.Н., Ширинян А.Ю., Галоян А.А. Ферменты углеводно-фосфорного обмена в костном мозге и селезенке при десиматизации. Эффект нейропептида PRP-1. Нейрохимия, 2009, т. 26, 4, с.333-336.
2. Тер-Татевосян Л.П., Ераносян Л.А., Аракелян Л.Н., Чалян С.Г. Механизм активации гликогенфосфорилазы нейропептидом ПБП-1. Роль цАМФ и ионов Ca^{2+} в передаче сигнала. Биол. ж.Армении, 2014, т.66(пр.1), с.97-102.
3. Тер-Татевосян Л.П., Саркисян Л.В., акад. Галоян А.А. Воздействие ПБП-1 на активность некоторых фосфатаз костного мозга белых крыс, пораженных циклофосфамидом. ДАН РА, 2008, т.108, 3, с.251-261.
4. Abrahamyan S.S., Meliksetyan I.B., Chavushyan V.A., Aloyan M.L., Sarkissian J.S. Protective action of snake venom Naja Naja Oxiana at spinal cord hemisection. Clinical Neuroscience, 2007, vol. 60, 3-4, p.148-153.
5. Davtyan T.K., Manukyan H.M., Hakopyan G.S., Avetisyan S.A. and Galoyan A.A. Hypothalamic proline-rich polypeptide is an oxidative burst regulator. Neurochem. Res., 2005, 30, p. 297-309.
6. Djurne G.A., Baldwin D.M. Evidence for cAMP as a mediator of gonadotropin secretion from female pituitaries. Ant. J.Physiol., 1987, vol. 253, p. E290-E295.
7. Galoyan A.A., Bezirganyan K.B., Davtyan T.K. Hypothalamic Proline Rich Polipeptide regulates hematopoieses. Neurochem. Res., 2009, vol. 35(6), p. 917-924.
8. Hudson J.W., Golding G.B., Crerar M.M. Evolution of allosteric control in glycogen phosphorylase. J. Mol. Biol., 1993, 234: 700-721.
9. Illingworth B., Cori G.T. Crystalline muscle phosphorylase, Biochemistry Preparations, 1953, v.3, p. 1-9.

10. *Madsen N.B.* Glycogen phosphorylase. *The Enzymes*, 1986, vol. 17, p. 366-394.
11. *Newgard G.B., Hwang P.K., Fletterick R.J.* The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Brit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1989, 24, p. 66-99.
12. *Pawson T., Raina M., Nasg P.* Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Lett.*, 2002, 513(1) : 2-10.
13. *Taussky H., Shorr F.* *Biol. Chem.*, 1953, v.202, p.675-685.
14. *Ter-Tatevosyan L.P., Sarkissyan L.V., Aslanyan I.G., Galoyan A.A.* Effect of PRP-1 on the activity of some phosphatases in white rats bone marrow in norm and at stimulation of hypothalamus neurosecretory nuclei. *Dokl. NAS. RA*; 2006, 106(4), p. 349-353.