

Г. С. ХАЧАТРЯН, Ц. М. СУДЖЯН

АКТИВНОСТЬ ФОСФОРИЛАЗА Б КИНАЗЫ В МОЗГЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПСИХОТРОПНЫХ ВЕЩЕСТВ И ЦИКЛО—АМФ

Изучалось влияние цикл. 3',5'-АМФ, ингибиторов моноаминоксидазы—ипразида и трансамина и их сочетанное действие на активность фосфорилаза б киназы в мозге крыс. Полученные данные свидетельствуют о наличии активирующего влияния цикл. 3',5'-АМФ на активность этого фермента как в опытах *in vitro*, так и *in vivo*, а также выявляют определенные сдвиги в активности фосфорилаза б киназы под влиянием ИМАО.

Биологическая роль фосфорилаза б киназы (АТФ : фосфорилаза фосфотрансфераза; ЕС 2.7.1.38) недостаточно изучена в нервной ткани [12]. Показано, что цикл. 3',5'-АМФ играет важную роль в передаче информации многих гормональных воздействий при регуляции функций и метаболизма в клетках [32]. Механизм адренэргической стимуляции гликогенолиза *in vivo* включает повышение синтеза цикл. 3',5'-АМФ, который ускоряет переход неактивной фосфорилаза б киназы в активную с последующим переводом фосфорилазы б в фосфорилазу а [7, 23, 26]. Повышение содержания этого вещества в мозге как в опытах *in vivo* [9], так и *in vitro* [24, 28] вызывают катехоламины (норадреналин, адреналин). По представлению Стельманса и др. [31], действие его реализуется через протеникиназу, которая может катализировать по меньшей мере две реакции: активирование инактивной киназы фосфорилазы б и переход гликогенсинтетазы а в гликогенсинтетазу б. Однако протеинкиназы, участвующие в указанных реакциях, имеют разные параметры. Учитывая исключительно важную роль цикл. 3',5'-АМФ в переключении путей обмена углеводов, мы поставили перед собой задачу изучить активность фосфорилаза б киназы под влиянием цикл. 3',5'-АМФ и ингибиторов моноаминоксидаз (ИМАО), тормозящих окислительное дезаминирование катехоламинов и приводящих к их накоплению в организме [33], в том числе и в мозге [36].

Материал и методика. Опыты ставили на белых крысах-самцах. Цикл. 3',5'-АМФ, фирмы Сигма, вводили интрацестернально [1] в количестве 2,28 нМ/г мозга [25, 27] за 15 мин до исследования мозга, после замораживания животных в жидком азоте. При выборе времени и доз введения ИМАО—ипразида и трансамин—придерживались описанной нами ранее схемы исследований [6]. В опытах *in vitro* цикл. 3',5'-АМФ, ипразид и трансамин вносили в концентрациях, рассчитанных на вес ткани в пробе, соответствующих опытам *in vivo*, пробы инкубировали в течение 15 мин. Конечная концентрация цикл. 3',5'-АМФ в инкубационной среде составляла 1,2 нМ.

Выделение и очистку фосфорилаза б киназы проводили по методу Кребса [20]. Замороженную мозговую ткань гомогенизировали с 2,5 объемами нейтральной 4×10^{-3} М

ЭДТА в течение 2 мин при 0°C, гомогенат центрифугировали в течение 40 мин при 6000g. Надосадочный слой фильтровали через стеклянную вату для отделения липидных веществ. На втором этапе pH холодного экстракта соответствовал 6,9, который приводили к pH 6,1 с 1 н. уксусной кислотой; появлялась небольшая муть. Ставили в ледяную баню на 10 мин, затем смесь центрифугировали при 0°C в течение 30 мин при 6000g. Полученный осадок извлекали тремя мл 0,1 м натрий-β-глицерофосфата, содержащего 4×10^{-3} М ЭДТА (pH 8,2). В дальнейшем добавляли 3,0 мл 0,5 м натрий-β-глицерофосфата, содержащего 2×10^{-3} М ЭДТА (pH 7,0), и проводили гомогенизацию с тефлоновым пестиком. Конечный pH смеси был равен 7,1. На третьем этапе полученную суспензию немедленно центрифугировали при 0°C в течение 90 мин при 30000 об/мин в центрифуге Спинко L2/65K. На четвертом этапе надосадочную жидкость центрифугировали при 0°C в течение 180 мин при 40000 об/мин. На полученный осадок насливали 1 мл 0,05 М натрий-β-глицерофосфата с 2×10^{-2} М ЭДТА (pH 7,0), оставляли на 12 час для полного растворения осадка при 0°C. На следующий день добавляли еще 1 мл того же раствора, слегка взболтав его. На пятом этапе к смеси добавляли по каплям насыщенный при 0°C аммоний сульфат до достижения 30% насыщения. Оставляли 30 мин и центрифугировали при 10000g в течение 15 мин. К осадку добавляли 0,2 мл охлажденной дистиллированной воды и 1 мл 0,05 м натрий-β-глицерофосфата, 2×10^{-2} М ЭДТА буфера с pH 6,8. Эту фракцию затем диализировали против того же буфера для удаления аммоний сульфата. Для определения активности фосфоорилаза б киназы к 0,2 мл 0,125 М трис-0,125 М натрий-β-глицерофосфатному буферу (pH 8,6 или 6,8) добавляли 0,2 мл фосфоорилазы б (около 5620 ед) и 0,1 мл фосфоорилаза б киназы. Смесь помещали в баню при 30°C и через 2 мин добавляли 0,1 мл $1,8 \times 10^{-3}$ М АТФ и 6×10^{-2} М $Mg(CH_3COO)_2$. Через 5 мин 0,1 мл надосадочной жидкости переносили в 1,9 мл 0,04 М натрий-β-глицерофосфат, 0,03 М цистеиновый буфер с pH 6,8. Определение активности, образующейся фосфоорилазы а, проводили в отсутствие АМФ методом Кори [11]. В контрольную пробу добавляли раствор киназы после 2-минутного кипячения в том же объеме. Выделение фосфоорилазы б из скелетных мышц кролика и удаление АМФ в дальнейшем из раствора кристаллической фосфоорилазы б проводили методом Фишера и Кребса [15]. Определение единиц фосфоорилазы проводили методом Кори [11]. Количество освобожденного неорганического фосфата определяли по методу Фиске и Субарроу [16]. Фосфоорилазу б рекристаллизовывали дважды. За единицу фосфоорилаза б киназы принимали то количество фермента, которое катализировало образование 100 ед. фосфоорилазы а в течение 5-и мин на мл киназной реакционной смеси при стандартных условиях. Специфическую активность выражали числом единиц ферментативной активности на мг белка [21].

Результаты и обсуждение. Результаты исследований, приведенные в табл. 1, показывают, что активность фосфоорилаза б киназы в мозге контрольной группы крыс во фракции, осажденной при 40 000 об/мин, при pH 6,8 составляет $4,77 \pm 0,41$ ед/мг белка, а при pH 8,2— $25,0 \pm 0,26$ ед/мг белка. Отношение активности киназы при pH 6,8/8,2 соответствует 0,19.

Введение цикл. 3',5'-АМФ в наших опытах за 15 мин до начала исследования мозга вызывает повышение активности фосфоорилаза б киназы при pH 8,2 и более значительное повышение при pH 6,8. Отношение активности киназы при pH 6,8/8,2 при этих условиях соответствует 0,24.

На основе полученных данных можно заключить, что цикл. 3',5'-АМФ в мозге крыс оказывает действие, аналогичное механизму, выявленному в отношении мышц и печени [34]. АТФ в этой реакции служит фосфатным донором, но реакция полностью зависит от присутствия цикл. 3',5'-АМФ [18]. Подспорьем для такого заключения является недавнее

Влияние цикл. 3',5'-АМФ, ипразида и трансамина *in vivo* на активность фосфорилаза б киназы в мозге крыс (n=5)

Условия опыта	Активность киназы, ед/мг белка		Отношение активности киназы при рН 6,8/8,2
	рН 6,8	рН 8,2	
Контроль	4,77 ± 0,041	25,0 ± 0,260	0,19
Цикл. 3',5'-АМФ 2,28 нМ/г и/ц	6,81 ± 0,023	27,16 ± 0,41	0,24
Ипразид 10 мг/100 г в/бр	< 0,001	< 0,01	
Ипразид 10 мг/100 г в/бр	5,10 ± 0,01	25,78 ± 0,21	0,20
Ипразид 10 мг/100 г в/бр + цикл. 3',5'-АМФ 2,28 нМ/г и/ц	< 0,01	> 0,05	
Ипразид 10 мг/100 г в/бр + цикл. 3',5'-АМФ 2,28 нМ/г и/ц	5,73 ± 0,16	26,52 ± 0,19	0,22
	< 0,02	> 0,02	
	> 0,01		
Трансамин 1 мг/100 г в/бр	3,08 ± 0,097	19,4 ± 0,288	0,15
	< 0,001	< 0,001	
Трансамин 1 мг/100 г в/бр + цикл. 3',5'-АМФ 2,28 нМ/г и/ц	4,06 ± 0,08	22,34 ± 0,32	0,18
	< 0,001	< 0,01	

обнаружение протейнкиназы мозга, активируемой цикл. 3',5'-АМФ [14, 22, 35].

Брекенриджем и Норманом [8] выявлена активация фосфорилазы а в мозге морской свинки вслед за аноксией, инсулиновой гипогликемией и под действием субконвульсивных доз амфетамина. Введение ипразида за 16 час. до начала исследования мозга вызывает в наших опытах повышение активности фермента при рН 6,8, при рН 8,2 сдвигов нет. Ранее нами было показано, что введение ипразида вызывает повышение активности α-глюканфосфорилазы и концентрации катехоламинов в мозге [2, 5]. Аналогичный эффект в отношении гликогенфосфорилазы мозга под влиянием ипразида наблюдался также другими авторами [17]. Повышенное содержание катехоламинов и повышение активности α-глюканфосфорилазы в мозге при повышенной активности фосфорилаза б киназы приводят к мысли, что, по-видимому, стимулирование перехода фосфорилазы б в фосфорилазу а может обусловить повышение активности α-глюканфосфорилазы после введения ипразида. Метаболическая роль взаимоперехода этих ферментов, по всей вероятности, заключается в экономной и адаптивной сборке менее активной формы фермента внутри клетки в ответ на условный сигнал, в то время как активная форма (фосфорилаза а), проявляющая максимальную активность в ответ на экстраклеточные сигналы, представляет собой экстраклеточную форму фермента [29].

При сочетанном введении ипразида с цикл. 3',5'-АМФ повышается активность фосфорилаза б киназы мозга при рН 6,8, и несколько — при рН 8,2, если сравнить с результатами опытов, полученными после введения только ипразида. Однако уровень ее не достигает такого после введения цикл. 3',5'-АМФ. Введение другого ИМАО — трансамина — в наших опытах вызывает понижение активности фосфори-

лаза б киназы при рН 6,8, так и при рН 8,2. Эти данные хорошо согласуются с результатами наших предыдущих исследований, где трансамина значительно понижал активность α -глюканфосфорилазы как в мозге, так и в печени [2].

При сочетанном введении трансамина и цикл. 3',5'-АМФ повышается активность фермента при рН 6,8 и 8,2 по сравнению с активностью его после введения только трансамина, однако она не достигает контроля.

Интерес представляло изучение тех же веществ в опытах *in vitro*. Внесение как цикл. 3',5'-АМФ, так и ипразида в пробы при инкубации в течение 15 мин приводит к повышению активности киназы при рН 6,8 и 8,2. Совместное внесение цикл. 3',5'-АМФ и ипразида в пробы значительно повышает этот показатель при обоих рН, причем степень этого повышения более выражена, чем в опытах с ипразидом и с цикл. 3',5'-АМФ. Трансамин при тех же условиях опыта вызывает значительное понижение активности фосфорилаза б киназы как при рН 6,8, так и при рН 8,2. При сочетании цикл. 3',5'-АМФ с трансамином аннулируется понижающее влияние трансамина на активность этого фермента.

Таблица 2

Влияние цикл. 3',5'-АМФ, ипразида и трансамина *in vitro* на активность фосфорилаза б киназы в мозге крыс
(n=5)

Условия опыта	Активность киназы, ед/мг белка		Отношение активности киназы при рН 6,2/8,2
	рН 6,8	рН 8,2	
Контроль	4,77±0,02	25,0±0,09	0,18
Цикл. 3',5'-АМФ	7,74±0,15	26,90±0,38	0,29
	$<0,001$	$<0,001$	
Ипразид	6,30±0,15	26,22±0,16	0,24
	$<0,001$	$<0,01$	
Ипразид+цикл. 3',5'-АМФ	8,52±0,16	29,94±0,33	0,21
	$<0,001$	$<0,001$	
Трансамин	3,44±0,18	22,66±0,27	0,15
	$<0,001$	$<0,001$	
Трансамин+цикл. 3',5'-АМФ	6,28±0,16	26,26±0,23	0,22
	$<0,001$	$<0,001$	

Таким образом, в наших исследованиях выявлено активирующее влияние цикл. 3',5'-АМФ на активность фосфорилаза б киназы мозга крыс как в опытах *in vivo*, так и *in vitro*, особо выраженное при рН 6,8. Отношение активности фосфорилаза б киназы в мозге при рН 6,8 к таковой при рН 8,2 в наших опытах находится в пределах 0,2. Таким образом, оно выше, чем в скелетной мышце [19] и сердце [13].

В наших опытах выявлена разница во влиянии ИМАО—ипразида и трансамина—на активность фосфорилаза б киназы мозга как в опытах *in vivo*, так и *in vitro*: ипразид повышает активность фосфорилаза б киназы мозга, трансамин, напротив, понижает ее.

При сочетанном введении ипразида и цикл. 3',5'-АМФ имеет место потенцирование повышающего влияния ипразида на активность фосфо-

рилаза б киназы мозга при pH 6,8. В наших предыдущих исследованиях при изучении действия ипразида с цикл. 3',5'-АМФ на активность гликогенсинтетазы мозга было выявлено понижающее влияние цикл. 3',5'-АМФ на повышенную ипразидом активность общей гликогенсинтетазы, и особенно ее а-формы. Недавно была доказана способность фосфорилазы а подавлять активность синтетаза фосфатазы, катализирующей переход б-формы в а-форму гликогенсинтетазы [30]. Можно предположить, что повышение активности фосфорилаза б киназы в наших опытах при совместном введении цикл. 3',5'-АМФ и ипразида приводит к активированию перехода фосфорилазы б в а, которая путем подавления синтетаза фосфатазного перехода понижает активность а-формы гликогенсинтетазы в мозге крыс.

Ереванский медицинский институт,
лаборатория биосинтетических реакций мозга

Поступило 11.X 1974 г.

Գ. Ս. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Զ. Մ. ՍՈՒՋՅԱՆ

ՖՈՍՖՈՐԻԼԱԶԱ Ե ԿԻՆԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ՔԼԵՈՒԼԵՂՈՒՄ ՊՈՆԵՈՏՐՈՊ ԵՅՈՒԹԵՐԻ ԵՎ ՑԻԿԼԻ 3',5 ԱՄՖ-Ի ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՏԱԿ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ֆոսֆորիլազա և կինազա ֆերմենտը անջատվել և մաքրվել է 40000 պտ/ր դեպքում: Ցիկլիկ 3',5' ԱՄՖ բարձրացնում է ուսումնասիրվող ֆերմենտի ակտիվությունը ինչպես in vivo, այնպես էլ in vitro փորձերում: Մոնոամինոօքսիդազայի արգելակիչ իպրազիդը առաջ է բերում ֆոսֆորիլազա և կինազա ֆերմենտի ակտիվության բարձրացում pH 6,8-ում:

Բարձրացումը շարունակվում է նաև նրա ու ցիկլիկ 3',5' ԱՄՖ-ի համատեղ ներմուծման ժամանակ: In vitro փորձերում իպրազիդը բարձրացնում է ֆերմենտի ակտիվությունը pH 6,8 և 8,2-ում: Մոնոամինոօքսիդազայի մյուս արգելակիչ տրանսամինը իջեցնում է ֆերմենտի ակտիվությունը թե՛ in vivo, և թե՛ in vitro փորձերում:

α-գլյուկան ֆոսֆորիլազայի ակտիվության բարձրացումը, որը ի հայտ է բերվել մեր նախկին փորձերում իպրազիդի ազդեցության տակ, պետք է ենթադրել, որ պայմանավորված է ֆոսֆորիլազա և կինազայի ակտիվության բարձրացումով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Фельдберг В. Фармакологический подход к изучению мозга. Л., 1971.
2. Хачатрян Г. С., Суджян Ц. М. и др. Мат-лы научной сессии Ер. мед. ин-та, посвящен. 100-летию со дня рождения В. И. Ленина, Ереван, 280, 1970.
3. Хачатрян Г. С., Суджян Ц. М. Вопросы мед. химии, 17, 3, 254, 1972.
4. Хачатрян Г. С., Суджян Ц. М. Биологический журнал Армении, 25, 8, 1972.
5. Хачатрян Г. С., Суджян Ц. М. Биологический журнал Армении, 26, 8, 1973.
6. Хачатрян Г. С., Суджян Ц. М. Вопросы мед. химии, 19, 5, 539, 1973.
7. Breckenridge В. М., Norman J. H. J. Neurochem., 9, 383, 1962.

8. Breckenridge B. M., Norman J. H. J. Neurochem., 12, 1, 51, 1965.
9. Burkard W. P. J. Neurochem., 19, 11, 2615, 1972.
10. Cohen Ph., Antoniow J. FEBS Lett., 34, 1, 43, 1973.
11. Cori G. T. et al. Methods in Enzymology, 1, 200, 1955.
12. Drummond G. I. et al. Arch. Biochem. Biophys., 105, 156, 1964.
13. Drummond G. I., Dungan L. J. Biol. Chem., 241, 3097, 1966.
14. Drummond G. I., Bellward G. J. Neurochem., 17, 4, 475, 1970.
15. Fischer E. H., Krebs E. G. Methods in Enzymology, 5, 369, 1962.
16. Fiske C. H., Subbarow L. J. Biol. Chem., 66, 375, 1925.
17. Kakiuchi S., Rall T. W. Mol. Pharmacol., 4, 379, 1968.
18. Jost J., Rickenberg W. Ann. Rev. Biochem., 40, 755, 1971.
19. Krebs E. G. et al. Biochemistry, 3, 1022, 1964.
20. Krebs E. G. Methods in Enzymology, 8, 543, 1966.
21. Lowry O. et al. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
22. Miyamoto E. et al. J. Biol. Chem., 244, 6395, 1969.
23. Namm D. H., Mayer S. E. Mol. Pharmacol., 4, 61, 1968.
24. Palmer G. C. et al. Neuropharmacol., 12, 4, 327, 1973.
25. Paul M. et al. Pharmacol., 3, 148, 1970.
26. Posner J. B. et al. J. Biol. Chem., 240, 982, 1965.
27. Schmidt M. J. et al. Science, 173, 4002, 1142, 1971.
28. Schultz J., Daly J. W. J. Neurochem., 21, 3, 573, 1973.
29. Segal H. L. et al. In: Metabolic Interconversion of Enzymes. Berlin, New York, 1972.
30. Segal H. Science, 180, 4081, 25, 1973.
31. Stalmans W. et al. In: Metabolic Interconversion of Enzymes, Berlin, New York, 1972.
32. Sutherland E. W. Science, 177, 4047, 401, 1972.
33. Udenfriend S., Weissbach H. Pharmacol., Exper. Therap., 120, 255, 1957.
34. Walsh D. A. et al. J. Biol. Chem., 243, 3763, 1968.
35. Weller M., Rodnight R. Nature, 225, 187, 1970.