

АКТИВНОСТЬ J- и D-ФОРМ ГЛИКОГЕН-СИНТАЗЫ  
 ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ  
 ЕСТЕСТВЕННЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ  
 РАЗДРАЖИТЕЛЕЙ И ЦИКЛИЧЕСКОЙ АМФ

Ц. М. СУДЖЯН

При внутрицестернальном введении цАМФ за 15 и 30 мин до начала опыта в головном мозге крыс обнаруживается значительное падение активности J-формы гликоген-синтазы, а за 30 мин до выработки пищевого возбуждения увеличение ее активности. На фоне условнорефлекторного пищевого торможения введение цАМФ за 15 мин до начала опыта не предотвращает увеличения активности J-формы гликоген-синтазы, обусловленного действием данного физиологического раздражителя.

*Ключевые слова:* гликоген-синтаза, циклический АМФ.

Гликоген-синтаза (ГС) — основной фермент, обеспечивающий биосинтез гликогена путем переноса глюкозильной группы УДФглюкозы (УДФГ) на молекулу гликозила. В мозговой и других тканях он присутствует в двух молекулярных формах (J и D). J—форма, лишенная ковалентного фосфата, проявляет активность в отсутствие глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф), D—форма, содержащая ковалентный фосфат, активна в присутствии Г-6-Ф. В исследованиях последних лет [11, 17, 19] выявлено множественное фосфорилирование субъединиц ГС. Это оригинальное открытие диктует необходимость дальнейшего изучения регуляции активности ГС, в частности, взаимоперехода ее фосфорилированной и дефосфорилированной форм. Молекулярные основы и регуляция взаимоперехода J- и D-форм ГС, интенсивно исследованные в отношении мышц и печени, недостаточно разработаны для мозговой ткани.

В наших предыдущих исследованиях [4] показаны различия в кинетических свойствах J- и D-форм ГС мозга; предпринято было также исследование [7] фосфо- и дефосфо-форм ГС в мозге при его различных функциональных состояниях. Показано [6], что при действии тех же раздражителей имеет место мобилизация физиологически активных веществ, транмиттеров, в том числе и катехоламинов.

В регуляции обмена гликогена непосредственное участие принимает циклический 3',5'-АМФ (цАМФ). Он стимулирует активность цАМФ-зависимой протеинкиназы, которая катализирует перенос фосфата из АТФ в ферменты, лимитирующие уровень гликогена в тканях. Наряду с этим, имеются данные об изменении функциональной активности

нервной ткани под влиянием цАМФ [1, 2, 12]. Предполагается также [9, 15], что зависимое от цАМФ фосфорилирование в синаптической мембране может приводить к изменению ионной проницаемости и к модификации синаптической передачи. В свете вышесказанного несомненно интересным является изучение активности J- и D-форм ГС мозга под действием цАМФ в условиях изменения функционального состояния ЦНС под влиянием естественных физиологических воздействий.

*Материал и методика.* Функциональные состояния мозга вырабатывали у белых крыс-самцов условнорефлекторным методом [5] с последующим определением активности ГС (УДФГ: гликоген- $\alpha$ -4-глюкозил трансфераза, КФ 2.4.1.11). Выделение и очистку пируваткиназы, используемой при определении активности ГС, проводили из скелетных мышц кролика. Всего использованы 480 крыс и 8 кроликов. В нужный момент функциональной активности мозга (пищевое, условнорефлекторное пищевое возбуждение и условнорефлекторное пищевое торможение) экспериментальные животные подвергались замораживанию в жидком азоте. Крысам внутривенно (в/в) вводили цАМФ (фирмы Sigma) в количестве 2,28  $\mu$ моль/г мозга в физиологическом растворе за 15 и 30 мин до начала опыта. При изучении действия цАМФ в сочетании с физиологическими раздражителями результаты опытов сравнивали с данными у крыс с выработанным функциональным состоянием, которым взамен цАМФ вводили в/в физиологический раствор. ГС мозга выделяли при 41000 g методом Виллар-Паласа и соавт. [20], предложенным для печеночной ткани и видоизмененным нами применительно к мозговой ткани [7]. В каждую пробу брали мозг 3-х крыс. Все процедуры проводили при 0—4°. Активность ГС определяли по методу Лелуара и Гольдберг [13]. Активность общей ГС определяли в присутствии Г-6-Ф, активность J-формы фермента — в его отсутствие. По разности активностей общей и J-формы ГС судили об активности D-формы фермента. Удельную активность ГС выражали в  $\mu$ мкмоль УДФ на 1 мг белка [14].

*Результаты и обсуждение.* Изменения активности общей ГС, ее J- и D-форм, выделенных во фракции мозга при 41000 g, при введении цАМФ и действия физиологических раздражителей приведены в таблице.

Установленные нами уровни активности изученных форм ГС после внутривенного введения 0,1 мл физ. раствора у контрольной группы животных сопоставимы с результатами предыдущих исследований [8]. При том же пути введения цАМФ в количестве 2,28  $\mu$ м/г мозгового вещества за 15 мин до начала опыта отмечается увеличение общей активности ГС, при значительном падении активности ее J-формы. Соответственно этому наблюдается также снижение и доли активности J-формы ГС, составляющей примерно 6,68 против 8,54 % в контрольных опытах. При введении цАМФ за 30 мин до исследования мозговой ткани на фоне отсутствия изменений в общей активности ГС в головном мозге обнаруживается значительное понижение активности J-формы фермента. На основании этого можно допустить, что увеличение концентрации цАМФ в головном мозге, вызванное его внутривенным введением, может стимулировать активность цАМФ-зависимой киназы ГС и ускорить переход J-формы в D-форму.

При введении цАМФ за 15 мин до начала опыта крысам с пищевым возбуждением констатируется снижение активности J-формы при отсут-

Активность J- и D-форм ГС в головном мозге крыс при действии физиологических раздражителей и цАМФ, введенного *in vivo*, n=10

Условия опыта	Активность ГС, мкмоль УДФ/мг белка/мин		Активность J-формы, % от общей
	J + D-формы	J-форма	
Контроль			
в/ц физ. р-р за 15 мин	35,62±0,38	3,06±0,11	8,54
в/ц физ. р-р за 30 мин	35,06±0,26	2,97±0,10	8,43
цАМФ за 15 мин в/ц	38,14±0,36*	2,56±0,10***	6,68
цАМФ за 30 мин в/ц	34,92±0,33 <sup>000</sup>	2,57±0,11***	7,32
Физ. р-р в/ц, через 15 мин — пищевое возбуждение	39,27±0,74**	4,16±0,13*	10,57
Физ. р-р в/ц, через 30 мин — пищевое возбуждение	40,95±0,62*	3,85±0,04*	9,33
цАМФ в/ц, через 15 мин — пищевое возбуждение	38,49±0,38 <sup>000</sup>	2,86±0,10*	7,35
цАМФ в/ц, через 30 мин — пищевое возбуждение	38,67±0,44 <sup>0</sup>	3,51±0,05*	9,0
Физ. р-р в/ц, через 15 мин — условно-рефлекторное пищевое возбуждение	38,30±0,47***	3,93±0,10*	10,22
Физ. р-р в/ц, через 30 мин — условно-рефлекторное пищевое возбуждение	38,16±0,36*	3,18±0,10 <sup>000</sup>	8,23
цАМФ в/ц, через 15 мин — условно-рефлекторное пищевое возбуждение	39,65±0,45 <sup>000</sup>	3,82±0,14 <sup>000</sup>	9,62
цАМФ в/ц, через 30 мин — условно-рефлекторное пищевое возбуждение	37,26±0,42 <sup>000</sup>	2,83±0,10 <sup>00</sup>	7,57
Физ. р-р в/ц, через 15 мин — условно-рефлекторное пищевое торможение	43,94±0,95*	4,23±0,14*	9,56
Физ. р-р в/ц, через 30 мин — условно-рефлекторное пищевое торможение	42,28±0,50*	3,88±0,12*	9,11
цАМФ в/ц, через 15 мин — условно-рефлекторное пищевое торможение	42,71±0,76 <sup>000</sup>	3,67±0,03***	8,50
цАМФ в/ц, через 30 мин — условно-рефлекторное пищевое торможение	40,96±0,50 <sup>000</sup>	3,78±0,09 <sup>000</sup>	9,23

\* P<0,001; \*\* P=0,001; \*\*\* P<0,01;

<sup>0</sup> P<0,02; <sup>00</sup> P<0,05; <sup>000</sup>>0,05.

ствии изменений в общей активности ГС. Доля активности J-формы в общей активности фермента убывает, составляя 7,35 по сравнению с 10,57% у крыс с пищевым возбуждением. При введении белым крысам с пищевым возбуждением цАМФ за 30 мин до взятия мозговой ткани на исследование активность J-формы понижается при некотором падении и общей активности ГС мозга. Сравнение результатов исследования влияния пищевого возбуждения на фоне действия цАМФ при введении последнего за 30 мин до начала опыта с данными, полученными при введении за 15 мин, выявляет заметное возрастание активности J-формы ГС с увеличением доли активности фермента с 7,35% (при введении цАМФ за 15 мин до начала опыта) до 9,0% (при введении цАМФ за 30 мин крысам с пищевым возбуждением).

Введение цАМФ за 15 мин до начала опыта крысам с условным возбуждением характеризуется сохранностью высокого уровня активности J-формы ГС, мало чем отличающегося от ее уровня у крыс с условно-рефлекторным возбуждением. Дача цАМФ за 30 мин до взятия

мозга в опыте приводит к снижению активности этой формы фермента по сравнению с аналогичным показателем у крыс с условнопищевым возбуждением. Эти сдвиги сопровождаются одновременным понижением в головном мозге белых крыс содержания гликогена, связанного с белками. При введении цАМФ за 15 мин до начала опыта на фоне условнорефлекторного пищевого торможения сохраняется повышенный уровень общей активности ГС по сравнению с таковым при данном функциональном состоянии ЦНС.

Результаты исследований по изучению общей активности ГС и J-формы с введением цАМФ за 30 мин до взятия мозговой ткани в опыте не расходятся с результатами, полученными при условном торможении. Иначе говоря, при этих условиях цАМФ вызывает такие же метаболические отклонения, которые в целом характерны для данного функционального состояния ЦНС.

Таким образом, под влиянием цАМФ в головном мозге белых крыс с пищевым возбуждением выявляется значительное снижение активности J-формы ГС при отсутствии соответствующих изменений в общей ГС по сравнению с аналогичным показателем, полученным при изучении только эффектов данного функционального состояния. В головном мозге отмечается также понижение содержания общего гликогена в основном за счет формы, связанной с белками. Введение цАМФ за 30 мин до начала опыта у белых крыс с пищевым возбуждением приводит к повышению активности J-формы ГС и содержания гликогена, связанного с белками, по сравнению с опытами с введением цАМФ за 15 мин до начала эксперимента на фоне пищевого возбуждения. Надо полагать, что понижение запасов гликогена в мозге, имеющее место при введении цАМФ за 15 мин до начала опыта, индуцирует активность фосфатазы ГС на пути образования J-формы ГС, которая в последующем способствует повышению содержания в мозге гликогена, связанного с белками.

Изучение активности J- и D-форм ГС в мышцах и печени рядом авторов [10, 16] привело к предположению о существовании положительной корреляции между активностью J-формы ГС и биосинтезом гликогена. Данные, полученные нами, позволяют считать это предположение правомерным и в отношении мозговой ткани.

В опытах с условнопищевым возбуждением введение цАМФ за 15 мин до начала опыта не предотвращает увеличения общей активности ГС и J-формы фермента, вызванного данным функциональным состоянием ЦНС. При этом возрастает и содержание гликогена, связанного с белками, а также активность киназы фосфорилазы [3]. При введении цАМФ крысам с условнопищевым возбуждением за 30 мин до начала опыта прослеживается значительное снижение активности J-формы ГС и содержания общего гликогена за счет его белок- и липидсвязанной форм. Сопоставление этих данных приводит к мысли, что чувствительное возрастание активности киназы фосфорилазы головного мозга в начальный период воздействия цАМФ (за 15 мин до начала опыта)

индуцирует повышение активности фосфатазы ГС. Подавление процесса превращения D-формы ГС в J-форму может обусловить снижение активности последней, наблюдаемое у белых крыс с условнорефлекторным пищевым возбуждением при введении цАМФ за 30 мин до начала опыта.

Интересно отметить, что значительное повышение общей активности ГС и особенно J-формы фермента при условном торможении сохраняется и при сочетании его с введениями цАМФ. Повышенная общая активность ГС и особенно J-формы фермента в условиях увеличения концентрации цАМФ в мозге указывает на то, что в нервной ткани уровень активности J-формы ГС может регулироваться механизмом, не зависимым от цАМФ, а, возможно, обусловленным увеличением активности фосфатазы ГС. Как уже отмечалось нами ранее [4], можно полагать, что данное функциональное состояние ЦНС способно изменить действие цАМФ на активность J- и D-форм ГС головного мозга.

Ереванский государственный медицинский институт

Поступило 20.XI 1980 г.

ԱՌՆՏՆԵՐԻ ԳԼՈՒԴԵՂԻ ԳԼԻԿՈԳԵՆ-ՍԻՆՏԱԶԱՅԻ J-ԵՎ D-ՁԵՎԵՐԻ  
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԱԶԴԱԿՆԵՐԻ ԵՎ ՑԻԿԼԻԿ ԱՄՖ-Ի  
ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՄԲ

Յ. Մ. ՍՈՒՋՅԱՆ

*ՑԱՄՖ-ի ներքիստերնալ ներմուծումը (փորձի սկզբից 15 և 30 րոպե առաջ) առաջ է բերում գլիկոգեն-սինտազայի J-ձևի ակտիվության խիստ նվազում:*

*ՑԱՄՖ-ի ներմուծումն առնետների սննդային դրդումից 30 րոպե առաջ, ի տարբերություն այն փորձերի, որտեղ ՑԱՄՖ-ի ներմուծումը կատարվել է 15 րոպե առաջ՝ նույն ֆունկցիոնալ վիճակներում, նկատվում է գլիկոգեն-սինտազայի J-ձևի ակտիվության բարձրացում:*

*Պայմանական սննդային արգելակման ֆոնի վրա ՑԱՄՖ-ի ներմուծումը (ուղեղի ուսումնասիրությունից 15 րոպե առաջ) չի կանխում գլիկոգեն-սինտազայի J-ձևի ակտիվության բարձրացումը, որը պայմանավորված է տվյալ արգակի արգեցությամբ:*

THE ACTIVITY OF RAT BRAIN J- AND D-FORMS GLYCOGEN-SYNTASE UNDER DIFFERENT FUNCTIONAL CONDITIONS AND CYCLIC 3', 5'-AMP

Ts. M. SUDJAN

Intracisternal injection of cAMP (15 min and 30 min before the experiments) to rats inhibites the activity of brain J-form glycogen syntase.

Injection of cAMP to rats 30 min before the experiment with food stimulation increases the activity of J-form glycogen syntase in comparison with the enzyme activity of rats with the same functional conditions of the brain, but the injection of cAMP was 15 min before the experiment.

Injection of cAMP (15 min before the experiment) to rats with conditioned food inhibition did not prevent the effect of this functional state.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Кометиани П. А.* Изв. АН Груз. ССР, сер. биол., 3, 101, 1977.
2. *Либерман Е. А., Минина С. В.* I Всесоюз. симп. циклические нуклеотиды. Красноярск, 83, 1976.
3. *Суджян Ц. М.* Ж. exper. и клинич. медицины, 19, 41, 1979.
4. *Суджян Ц. М.* Вопр. мед. химии, 26, 243, 1980.
5. *Хачатрян Г. С.* Биохимия головного мозга. Ереван, 1967.
6. *Хачатрян Г. С., Степанян Л. А.* Мат-лы 49-й научн. сессии Ер. мед. ин-та, 141, 1971.
7. *Хачатрян Г. С., Суджян Ц. М.* Вопр. мед. химии, 19, 539, 1973.
8. *Хачатрян Г. С., Суджян Ц. М.* Ж. exper. и клинич. медицины, 15, 3, 1975.
9. *Greengard P.* Nature. 260, 101, 1976.
10. *Hers H. G., De Wulf H., Stalmans W.* Fed. Eur. Biochem., Soc., Lett., 12, 73, 1970.
11. *Huang K. P., Huang F. L., Glinsmann W. H. and Robinson J. C.* Arch. Biochem-Biophys., 173, 162, 1976.
12. *Krivanek J.* Brain Res., 120, 493, 1977.
13. *Leloir L. F., Goldemberg S.* Meth. in Enzymol., 5, 145, 1962.
14. *Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R.* J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
15. *Nathanson J. A.* Physiol. Rev., 57, 157, 1977.
16. *Piras R., Rothman L., Cabib E.* Biochemistry, 7, 56, 1968.
17. *Roach P. J., Larner J.* Mol. and Cell. Biochem., 15, 179, 1977.
18. *Smith C. H., Brown N. E., Larner J.* Biochim. Biophys. Acta., 242, 81, 1971.
19. *Soderling T. R.* J. Biol. Chem., 250, 5407, 1975.
20. *Villar-Palasi C., Rosell-Perez M., Hizukuri S., Huljing F., Larner J.* Meth. Enzymol., 8, 382, 1966.