ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

Էքսպեր. և կլինիկ. բժշկ. հանդես

XIX, № 4, 1979

Журн. экспер. и клинич. медицины

УДК 612.3:612.015

Ц. М. СУДЖЯН

АКТИВНОСТЬ КИНАЗЫ ФОСФОРИЛАЗЫ *б* МОЗГА ПОД ВЛИЯНИЕМ ЕСТЕСТВЕННЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ РАЗДРАЖИТЕЛЕЙ И ЦИКЛИЧЕСКОЙ АМФ

Изучены изменения в активности киназы фосфорилазы *б* мозга при действии физиологических раздражителей и циклической АМФ. Результаты позволяют полагать, что повышение активности киназы под влиянием пищевого и условнорефлекторного пищевого возбуждения обусловлено циклическим АМФ.

Активность киназы фосфорилазы *б* повышается при пищевом возбуждении и условнорефлекторном пищевом возбуждении, понижается при условнорефлекторном пищевом торможении. При введении циклической 3′, 5′-АМФ (цАМФ) за 15 *мин* до начала опыта крысам с пищевым возбуждением повышается активность киназы по сравнению с активностью фермента у крыс с пищевым возбуждением. Аналогичны результаты при введении цАМФ крысам с условнорефлекторным пищевым возбуждением. Под влиянием цАМФ аннулируется тормозящее действие условнорефлекторного пищевого торможения на активность киназы мозга.

Нашими предыдущими исследованиями были выявлены [8] изменения в активности киназы фосфорилазы *б* мозга под влиянием психотропных веществ и циклической 3′, 5′-АМФ. Известно, что этот фермент занимает одно из центральных мест в системе каскадных реакций в реализации эффекта цАМФ. В результате осуществляется переход фосфорилазы *б* в фосфорилазу *а* и обеспечивается фосфоролитический распад гликогена. В этом аспекте представляет интерес изучение сдвигов в активности киназы фосфорилазы мозга при действии физиологических раздражителей, вызывающих мобилизацию физиологически активных веществ, трансмиттеров, в том числе и катехоламинов в мозге [6].

Некоторые исследования последних лет [1, 22] указывают на участие цАМФ в изменении функциональной активности нервной ткани. Введенный цАМФ вызывает увеличение проводимости и частоты генерации нервных импульсов в нейронах [2]. Различные деполяризующие агенты в опытах in vitro наряду с распространяющейся по коре мозга крыс депрессией вызывают повышение содержания цАМФ [20]. В свете этих

данных представляло интерес изучить влияние цАМФ на активность киназы фосфорилазы в условиях измененной функциональной активности нервной ткани под действием физиологических раздражителей.

Материал и методика

Функциональные состояния мозга вырабатывали у белых крыс-самцов условнорефлекторным методом [5] с последующим определением активности киназы фосфорилазы. Выделение и очистку фосфорилазы *б*, используемой при определении активности киназы фосфорилазы, проводили из скелетных мышц кролика. Всего в исследованиях использованы 720 крыс и 12 кроликов. В нужный момент функциональной активности мозга (пищевое, условнорефлекторное пищевое возбуждение и условнорефлекторное пищевое торможение) экспериментальные животные подвергались замораживанию в жидком азоте. Крысам внутрицистернально вводили цАМФ (фирма «Сигма») [4, 9] в количестве 2,28 *нмоль/г* мозга в физиологическом растворе за 15 *мин* до начала опыта. При подборе концентрации цАМФ исходили из его физиологического содержания в мозге [13, 23]. Результаты опытов по изучению влияния цАМФ в сочетании с физиологическими раздражителями сравнивали с данными опытов у крыс с выработанным функциональным состоянием, которым взамен цАМФ вводили физиологический раствор. В опытах in vitro цАМФ вносили в пробы в концентрациях, рассчитанных на вес ткани соответственно опытам in vivo. Инкубацию проб в опытах in vitro проводили в течение 15 *мин*. Выделение и очистку киназы фосфорилазы *б* (АТФ: фосфорилаза фосфотрансфераза КФ 2. 7. 1. 38) проводили по методу Krebs [19], предложенного для мышечной ткани с нашими видоизменениями [8]. В каждую пробу брали мозг от 6 крыс. Все этапы выделения фермента из мозговой ткани и его очистки проводили при 2°. Проведенная процедура очистки позволяет получить фермент киназы фосфорилазы, свободный от фосфатазы фосфорилазы, фосфорилазы и фосфофруктокиназы [9]. Активность киназы фосфорилазы определяли при pH 6,8 и 8,2, исходя из данных литературы о сравнительно низкой активности фермента при pH 6,8 и высокой—при pH 8,2 [14, 18]. К 0,2 *мл* 0,125 М трис-0,125 М натрий-β-глицерофосфатного буфера (pH 6,8 или 8,6) добавляли 0,2 *мл* фосфорилазы *б* (5620 Кори ед.) [12], полученной нами, и 0,1 *мл* киназы фосфорилазы; термостатировали при 30° и через 2 *мин* добавляли 0,1 *мл* $1{,}8\times10^{-3}$ М АТФ и 6×10^{-2} М $Mg(CH_3COO)_2$. В контрольную пробу киназу фосфорилазу не добавляли. При использовании буфера с pH 8,6 pH реакционной смеси равен 8,2. Для приостановления ферментативной реакции через 5 *мин* 0,1 *мл* этой смеси переносили в охлажденчый 1,9 *мл* 0,04 М натрий-β-глицерофосфат, 0,03 М цистеиновый буфер с pH 6,8. Определение активности образующейся фосфорилазы *а* проводили в отсутствии АМФ. Выделение из скелетных мышц кролика, очистку и получение кристаллической фосфорилазы *б* и дальнейшее удаление АМФ из раствора кристаллической

фосфорилазы *б* проводили по Fischer, Krebs [14]. Количество освобожденного неорганического фосфора определяли по Fiske, Subbarrow [15]. Оптическую плотность измеряли при 690 *нм* в кювете 1 *см*. За единицу киназы фосфорилазы принимали количество фермента, которое катализировало образование 100 *ед* фосфорилазы *а* в течение 5 *мин* на *мл* киназной реакционной смеси при 30°. Киназные единицы соответственно pH реакционной смеси обозначали pH 6,8 и pH 8,2 *ед*. Удельчую активность выражали числом единиц ферментативной активности на *мг* белка [21].

Результаты и обсуждение

Проведенная очистка киназы фосфорилазы, выделенной из мозга крыс, увеличила ее удельную активность в 19 раз по сравнению с гомогенатом. Изменения в активности этого фермента в мозге при действии физиологических раздражителей приведены в табл. 1.

Таблица 1

Активность киназы фосфорилазы в мозге крыс, n=5

Условия опыта	Активность киназы *ед/мг* белка, pH 6, 8	Отношение активности pH 6,8/8,2
Контроль	4,79±0,21	0,18
Пищевое возбуждение	6,83±0,30*	0,30
Условнорефлекторное пищевое возбуждение	6,68±0,32*	0,25
Условнорефлекторное пищевое торможение	3,12±0,26*	0,16

* $P<0,01$

У контрольной группы крыс активность киназы фосфорилазы, по средним данным, составляет при pH 6,8—4,79, а при pH 8,2—25 *ед/мг* белка. Отношение активности киназы при pH 6,8/8,2 равно 0,18. Интересно отметить, что отношение активности киназы фосфорилазы, выделенной из мозга кролика, при pH 6,8/8,2 равно 0, 19 [13 а] и совпадает с нашими результатами. При пищевом возбуждении повышена активность фермента при pH 6,8, отношение активности при pH 6,8/8,2 возрастает до 0,30 по сравнению с 0,19 в контроле. При условнорефлекторном пищевом возбуждении также повышена активность киназы при pH 6,8, отношение активности pH 6,8/8,2 равно 0,25. Известно, что отношение активности киназы фосфорилазы при pH 6,8/8,2 является показателем активации фермента [3]. Наблюдаемое повышение этого отношения как при пищевом, так и условнорефлекторном пищевом возбуждении свидетельствует об активации киназы фосфорилазы мозга. Выявленное нами повышение активности киназы фосфорилазы мозга может привести к повышению активности фосфорилазы *а*. При условнорефлекторном торможении активность фермента по сравнению с контролем понижается при pH 6,8 в 1,5, а при 8,2—1,3 раза. Благодаря тому, что при этом понижена активность киназы фосфорилазы при обоих pH, отношение активности при pH 6,8/8,2 неотличимо от контроля. По-

нижение активности киназы фосфорилазы *б* может обусловить понижение активности фосфорилазы *а*. Вместе с этим уровень активности фосфорилазы *а* может регулироваться и активностью фосфатазы фосфорилазы, катализирующей переход фосфорилазы *а* в *б* форму. В исследованиях Г. С. Хачатряна [5] выявлено увеличение содержания глюкозы в мозге при данном функциональном состоянии. Между тем установлено, что под влиянием глюкозы стимулируется активность фосфатазы фосфорилазы и соответственно понижается активность фосфорилазы *а* [24]. Фосфатаза фосфорилаза, выделенная из скелетных мышц кролика, инактивируется при инкубации с цАМФ зависимой протеинкиназой. На основе этих и других исследований был сделан вывод, что активность фосфатазы фосфорилазы находится под контролем цАМФ зависимой протеинкиназы. Контроль осуществляется путем фосфорилирования и дефосфорилирования белкового ингибитора фосфатазы фосфорилазы [16, 25]. При условнорефлекторном торможении в наших опытах в

Таблица 2

Активность киназы фосфорилазы при действии физиологических раздражителей и цАМФ, введенного in vivo, n=5

Условия опыта	Активность киназы *ед/мг* белка, pH 6, 8	Отношение активности pH 6,8/8,2
Контроль	4,79±0,21	0,18
цАМФ за 15 *мин* и/ц	6,82±0,24**	0,25
Физ. р-р и/ц, через 15 *мин* пищевое возбужденне	6,83±0,30	0,30
цАМФ и/ц, через 15 *мин* пищевое возбуждение	8,02±0,33*	0,28
Физ. р-р и/ц, через 15 *мин* условнорефлекторное пищевое возбуждение	6,68±0,32	0,25
цАМФ и/ц, через 15 *мин* условнорефлекторное пищевое возбуждение	8,98±0,31**	0,35
Физ. р-р и/ц, через 15 *мин* условнорефлекторное пищевое торможение	3,12±0,26	0,16
цАМФ и/ц, через 15 *мин* условнорефлекторное пищевое торможение	6,47±0,31***	0,26

* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$

мозге значительно повышена активность I-формы гликогенсинтетазы [7]. Сопоставление этих данных с результатами понижения активности киназы фосфорилазы при действии того же раздражителя выявляет корреляцию процессов, регулирующих пул гликогена при условнорефлекторном пищевом торможении.

В опытах, проведенных на скелетных мышцах кроликов [17, 26], доказано, что дефосфорилирование D-формы гликогенсинтетазы и киназы фосфорилазы катализируется одной и той же фосфопротеинфосфатазой

Активность киназы фосфорилазы повышается при внутрицистернальном введении цАМФ (табл. 2). При введении цАМФ крысам с пищевым возбуждением активность фермента достоверно повышается при pH 6,8 по сравнению с активностью у крыс с пищевым возбуждением. Необходимо отметить, что при этом степень повышения активности фермента превосходит таковую после введения только цАМФ. При введении цАМФ крысам с условнорефлекторным пищевым возбуждением активность фермента при pH 6,8 повышается в 1,3 раза по сравнению с активностью киназы фосфорилазы у крыс с данным функциональным состоянием мозга. При введении цАМФ на фоне пищевого возбуждения и условнорефлекторного пищевого возбуждения имеется некоторое повышение активности киназы фосфорилазы, по-видимому, за счет суммирования влияния физиологического раздражителя и цАМФ. Введение цАМФ крысам с условнорефлекторным торможением повышает активность фермента по сравнению с опытами у крыс с данным функциональным состоянием мозга.

Таблица 3

Активность киназы фосфорилазы под влиянием физиологических раздражителей и цАМФ, добавленного in vitro, n=5

Условия опыта	Активность киназы *ед/мг* белка, pH 6, 8	Отношение активности pH 6,8/8,2
Контроль	4,79±0,21	0,18
цАМФ, 15 *мин* инкубации	8,19±0,48**	0,31
Пищевое возбуждение, цАМФ, 15 *мин* инкубации	9,19±0,54**	0,33
Условнорефлекторное пищевое возбуждение, цАМФ, 15 *мин* инкубации	10,10±0,40**	0,37
Условнорефлекторное пищевое торможение, цАМФ, 15 *мин* инкубации	8,20±0,28***	0,31

В опытах in vitro при внесении цАМФ в инкубационную среду (табл. 3) повышается активность киназы фосфорилазы, причем отношение активности фермента при pH 6,8/8,2 достигает 0,31 по сравнению с 0,18 в контроле. Эти данные свидетельствуют о преимущественном возрастании активности фермента при pH 6,8 под влиянием цАМФ. В последующих опытах пробы мозговой ткани крыс с пищевым возбуждением инкубировали с цАМФ. При этом за 15 *мин* инкубации активность фермента повышалась при обоих значениях pH. Отношение активности фермента pH 6,8/8,2 достигает 0,33, что указывает на значительное повышение активности фермента при pH 6,8. Активность изучаемого фермента у крыс с условнорефлекторным пищевым возбуждением при инкубации проб с цАМФ превосходит таковую под влиянием только цАМФ. Результаты проведенных исследований склоняют нас к мысли, что повышение активности киназы фосфорилазы в мозге обусловлено цАМФ. Указание

в пользу этого заключения было получено и в опытах in vitro на мышцах кроликов, в которых степень активации киназы фосфорилазы является функцией концентрации цАМФ в системе [10]. При определении активности киназы фосфорилазы у крыс с условнорефлекторным торможением с последующей инкубацией проб с цАМФ активность фермента значительно повышается. Полученный уровень активности фермента неотличим от показаний активности фермента в присутствии цАМФ. Можно полагать, что цАМФ аннулирует тормозящее действие данного физиологического раздражителя на активность киназы фосфорилазы мозга.

Ереванский медицинский институт, лаборатория биосинтетических реакций мозга

Поступила 14/IV 1979 г.

Ց. Մ. ՍՈՒՋՅԱՆ

ԳԼԵՈՒՂԵՂԻ ՖՈՍՖՈՐԻԼԱԶԱ b ԿԻՆԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԱԶԴԱԿՆԵՐԻ ԵՎ ՑԻԿԼԻԿ 3′,5′-ԱՄՖ-Ի ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՏԱԿ

Ֆոսֆորիլազա b կինազա ֆերմենտի ակտիվությունը բարձրանում է pH 6,8 և 8,2 սննդային և պայմանական սննդային դրդման ժամանակ։ Պայմանական սննդային դրդման ֆոնի վրա մշակված արգելակման ֆերմենտի ակտիվությունը նվազում է։

Սննդային և պայմանական սննդային դրդումով առնետներին 15 րոպե առաջ մինչև փորձի սկիզբը ցիկլիկ 3′,5′-ԱՄՖ-ի ներցիտաերնալ ներմուծումը բերում է ֆոսֆորիլազա կինազայի ակտիվության բարձրացմանը համապատասխան ֆունկցիոնալ վիճակում եղած առնետների հետ համեմատած։ Կատարված փորձերի արդյունքներից կարելի է ենթադրել, որ տվյալ աղդակների ժամանակ ֆերմենտի ակտիվության բարձրացումը պայմանավորված է ցիկլիկ 3′,5′-ԱՄՖ-ով։

TS. M. SUDJAN

THE ACTIVITY OF BRAIN PHOSPHORYLASE b KINASE UNDER DIFFERENT FUNCTIONAL CONDITIONS AND CYCLIC AMP

The activity of phosphorylase b kinase in rat brain increased under food—and conditioned food stimulation, decreased during conditioned food inhibition. Injection of cyclic AMP (15 min before the experiment) to rats with food—and conditioned food stimulation increased the activity of phosphorylase b kinase in comparison with the enzyme activity of rats with the same functional conditions of the brain. Under the influence of cyclic AMP it takes place the elimination of inhibitory effect on the brain kinase activity of conditioned food inhibition.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кометиани П. А.* Изв. АН Груз. ССР, сер. биол., 1977, 3, 2, 101.
2. *Либерман Е. А., Минина С. В.* I Всес. симп.: Циклич. нуклеотиды. Красноярск, 1976, 83.
3. *Ньюсхолм Э., Старт К.* Регуляция метаболизма. М., 1977.
4. *Фельдберг В.* Фармакологический подход к изучению мозга. Л., 1971.
5. *Хачатрян Г. С.* Биохимия головного мозга. Ереван, 1967.
6. *Хачатрян Г. С., Степанян Л. А.* Мат. 49-й научн. сессии Ер. мед. ин-та, 1971, 141.
7. *Хачатрян Г. С., Суджян Ц. М.* Биол. ж. Армении, 1972, т. 25, 8, 3.
8. *Хачатрян Г. С., Суджян Ц. М.* Биол. ж. Армении, 1975, т. 28, 5, 24.
9. *Berl* et al. J. Neurochem., 1961, 7, 186.
10. *Boyer J., Valette A.* Bull. Soc. Chim., Biol., 1970, 52, 3, 356.
11. *Cohen Ph., Antoniv J.* FEBS Lett., 1973, 34, 1, 43.
12. *Cori G. T.* et al. Meth. in enzym., 1955, 1, 200.
13 *Cramer H.* et al. J. Neurochem., 1971, 18, 8, 1605.
13a. *Drummond G. I., Bellward G.* J. of Neurochem., 1970, 17, 4, 475.
14. *Fischer E. H., Krebs E. G.* Meth. in enzym., 1962, 5, 369.
15. *Fiske C. H., Subbarrow L.* J. Biol. Chem., 1925, 66, 375.
16. *Huang F. L., Glinsmann W. H.* Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1975, 72, 8, 3004.
17. *Kato K., Bishop J. S.* J. Biol. Chem., 1972, 247, 7420.
18. *Krebs E. G.* et al. Biochemistry, 1964, 3, 1022.
19. *Krebs E. G.* Methods in enzym., 1966, 8, 543.
20. *Krivanek J.* Brain Res., 1977, 120, 3, 493.
21. *Lowry O. H.* et al. J. Biol. Chem., 1951, 193, 1, 265.
22. *Mc Illwain H.* Nature, 1970, 226, 803.
23. *Schmidt M.* et al. Science, 1971, 173, 4002, 1142.
24. *Stalmans W.* et al. Eur. J. Biochem., 1974, 41, 1, 127.
25. *Stalmans W.* et al. Metabolic Interconversion of Enzymes, 1972, 122.
26. *Zieve F. J., Glinsmann W. H.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, 50, 872.