

УДК 577.3. + 591.483

БИОХИМИЯ

Н. А. БЕРДИНА, Н. Л. ИВАНОВА, И. М. РОДИОНОВ

АКТИВАЦИЯ ФОСФОРИЛАЗЫ АЦЕТИЛХОЛИНОМ В ГОМОГЕНАТЕ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ КОШКИ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 24 XI 1972)

Известно, что в сосудах скелетных мышц при возбуждении симпатических волокон наряду с сосудосуживающими могут возникать и расширительные эффекты, которые блокируются атропином. Расширение можно наблюдать либо при раздражении симпатической цепочки на фоне действия альфа-блокаторов или резерпина, либо при раздражении некоторых центральных структур — гипоталамуса, среднего мозга и др. Считают, что к сосудам скелетных мышц идут холинэргические вазодилататоры ⁽¹⁻³⁾. Некоторые данные дают возможность полагать, что первым звеном влияния медиатора при холинэргической симпатической вазодилатации является поперечно-полосатое мышечное волокно, а расширение сосудов возникает в результате сдвига метаболизма в мышечных клетках ⁽⁴⁻⁷⁾. При холинэргическом расширении наблюдается увеличение продукции молочной кислоты скелетной мышцей и активация фосфорилазы в ней. Активация фосфорилазы наиболее значительна в самый начальный период развития расширительного эффекта. По-видимому, изменения активности этого фермента есть один из первых сдвигов, наблюдаемых в мышечном волокне при действии ацетилхолина, выделенного симпатическими окончаниями ⁽⁷⁾. На основании приведенных данных с большой степенью вероятности можно предполагать, что ацетилхолин способен активировать фосфорилазу мышечного волокна, причем это влияние не опосредовано через изменения скорости кровотока. Для дальнейшей аргументации этого предположения нами были поставлены опыты, в которых исследовалось влияние ацетилхолина на активность фосфорилазы в гомогенате скелетной мышцы.

Методика. У кошки под эфирно-уретановым наркозом из икроножной мышцы брали пробу ткани, сразу же замораживали ее в жидком азоте и растирали в мелкий порошок. Определение активности фосфорилазы проводилось по методу Херса ⁽⁸⁾ с небольшими модификациями. Среда выделения готовилась на бидистиллированной воде и содержала $5 \cdot 10^{-2}$ М трис-буфер (рН 6,8), $3 \cdot 10^{-3}$ М ЭДТА и 10^{-1} М NaF. Инкубационная среда, кроме компонентов среды выделения, содержала 0,2 М глюкозо-1-фосфат и 4% гликогена. Общую активность фосфорилазы определяли при том же составе инкубационной среды с добавлением $6 \cdot 10^{-2}$ М 5'-АМФ. Инкубационная среда (0,3 мл) нагревалась в течение 5 мин. при 37°, затем добавлялся гомогенат (0,1 мл, разведение 1:50) и проводилась инкубация в течение 5 мин. при 37°. Реакцию останавливали 5% ТХУ (0,4 мл). Об активности фермента судили по количеству отщепившегося неорганического фосфора, определяемого по методу Фiske и Суббароу ⁽⁹⁾. Ацетилхолин вводился непосредственно в инкубационную среду. Атропин в конечной концентрации 10^{-5} добавлялся в среду выделения, содержащую гомогенат. Вычисление статистической значимости различий в норме и при действии ацетилхолина проводилось методом, принятым для обработки парных данных ⁽¹⁰⁾.

Результаты исследования активности фосфорилазы в норме и при действии ацетилхолина в конечной концентрации 10^{-5} г/мл приведены в табл. 1. Как следует из приводимых данных, под влиянием ацетилхолина процентное содержание активной формы фосфорилазы (Φ_a) повышено. Отличия статистически значимы ($P < 0,01$). Повышение активности фосфорилазы не сопровождается никакими изменениями в уровне общей фосфорилазы.

Концентрация ацетилхолина, равная 10^{-5} г/мл, была выбрана не случайно. В опытах с разными концентрациями ацетилхолина выяснилось, что

Таблица 1

Активность фосфорилазы скелетной мышцы кошки в норме и при действии ацетилхолина (10^{-5} г/мл)

№№ п.п.	Дата	Норма			АЦХ		
		Φ_a , μ мол. Р на 1 г в 1 мин.	$\Phi_{об}$, μ мол. Р на 1 г в 1 мин.	$\Phi_a/\Phi_{об}$, %	Φ_a , μ мол. Р на 1 г в 1 мин.	$\Phi_{об}$, μ мол. Р на 1 г в 1 мин.	$\Phi_a/\Phi_{об}$, %
1	10 IV	17	40,3	42,2	40,5	53,7	75,4
2	11 IV	26,25	48,1	54,7	32,8	48,2	67
3	12 IV	82	109	75	97,3	109,5	88,5
4	16 VI	32,5	55	59	42,5	50	85
5	26 VI	43,75	143,12	30	60,62	123,12	49
6	28 VI	45,5	90	50,7	82,7	85,5	96,3
Средние		$41,1 \pm 9,26$	$80,9 \pm 16,47$	$51,9 \pm 6,23$	$59,4 \pm 10,53$	$78,3 \pm 13,34$	$76,9 \pm 6,96$

эта концентрация дает наиболее значительное увеличение активности фермента. Данные этой серии опытов представлены на рис. 1. В каждом отдельном опыте (он представлен на рисунке тремя вместе нарисованными столбиками) определялась активность фосфорилазы в норме, при действии ацетилхолина (10^{-5} г/мл) и какой-нибудь другой концентрации (от 10^{-4} до 10^{-14} г/мл).

Таблица 2

Влияние атропина ($1 \cdot 10^{-5}$) на активацию фосфорилазы ацетилхолином ($1 \cdot 10^{-5}$)

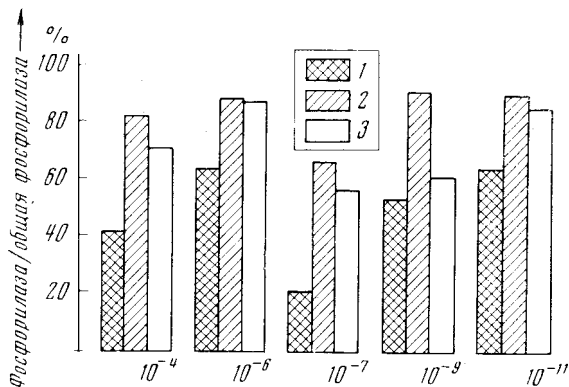
№№ п.п.	Дата	Гомогенат без атропина			Гомогенат с атропином		
		$\Phi_a/\Phi_{об}$, %		АЦХ атроп. — АЦХ без атроп.	$\Phi_a/\Phi_{об}$, %		АЦХ атроп. — АЦХ без атроп.
		норма	АЦХ $1 \cdot 10^{-5}$		норма	АЦХ $1 \cdot 10^{-5}$	
1	14 VI	72	88	16	61	60,1	1
2	20 VI	41	66	25	35	45	10
3	21 VI	43	70	27	59	59	—
4	22 VI	42	79	37	53	55	2
5	23 VI	75	87	12	78	85	7
6	1 VII	64	82	18	70	75	5
Средние		$56,1 \pm 6,5$	$78,6 \pm 3,66$	$22,5 \pm 3,69$	$59,3 \pm 6,04$	$63,2 \pm 5,85$	$3,8 \pm 1,73$

Как следует из рис. 1, любая из взятых концентраций ацетилхолина вызывала активацию фермента, однако при концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} увеличение активности было наиболее значительным.

Ранее было показано, что атропин в значительной мере снимает активацию фосфорилазы, вызываемую раздражением симпатической цепочки (?). Поэтому было интересно посмотреть, как изменяется активация фосфорилазы, вызываемая ацетилхолином непосредственно в гомогенате, при

действии атропина. Данные этой серии опытов представлены в табл. 2. Видно, что после введения атропина в среду с гомогенатом отличия в активности фосфорилазы значительно уменьшены. В среднем из 6 опытов увеличение активности фосфорилазы, вызываемое ацетилхолином, уменьшилось с 22,5 до 3,8% после предварительного введения атропина. Разница, полученная при действии ацетилхолина и ацетилхолина с атропином, статистически достоверна ($P < 0,01$).

Рис. 1. Влияние разных концентраций ацетилхолина на активность фосфорилазы в гомогенате скелетной мышцы кошки. Активность фосфорилазы без добавления ацетилхолина (1), при добавлении ацетилхолина в конц. $1 \cdot 10^{-5}$ г/мл (2) и при действии какой-либо другой концентрации ацетилхолина (3) (указано внизу)



Обсуждение. Приведенный материал дает возможность заключить, что ацетилхолин активирует фосфорилазу скелетной мышцы кошки *in vitro*. Наибольшая активация наблюдается при физиологических концентрациях, равных 10^{-5} – 10^{-6} г/мл.

Как уже упоминалось, активация фосфорилазы наблюдалась нами при раздражении симпатической цепочки на фоне действия альфа-блокаторов и при внутриартериальном введении ацетилхолина (7).

Результаты данной работы дают твердые основания предполагать, что активация фосфорилазы, наблюдаемая при холинэргическом симпатическом эффекте, обусловлена прямым влиянием ацетилхолина на поперечно-полосатое мышечное волокно, а не опосредована через изменение кровоснабжения мышцы. Этот вывод хорошо согласуется с предположениями, высказанными нами ранее по этому поводу (4–6). Так же, как и в случае действия симпатических волокон, активация фосфорилазы при действии ацетилхолина на гомогенат мышечной ткани почти полностью снимается атропином. По-видимому, при нервном влиянии или при внутриартериальном введении ацетилхолин, действуя на какой-то участок мембраны мышечного волокна, а может быть проникая внутрь него, активирует в нем фосфорилазу (7). Функциональное значение этого механизма активации гликогена состоит в увеличении работоспособности мышцы при сокращении в статическом режиме, когда кровоснабжение мышцы резко ограничено из-за высокого внутримышечного давления (4–6). Это — вторая медиаторная функция ацетилхолина на поперечно-полосатом мышечном волокне.

Механизм активации мышечной фосфорилазы ацетилхолином неясен. Мы не знаем пока, сходен ли этот механизм с механизмом влияния адреналина на этот фермент (11) или осуществляется при участии других промежуточных этапов.

Таким образом, ацетилхолин, добавленный в гомогенат икроножной мышцы кошки, увеличивает в нем активность фосфорилазы. Наибольший эффект наблюдается при действии ацетилхолина в конечной концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ (увеличение на 25%). Однако заметный эффект вызывают как более высокие, так и более низкие концентрации, до $1 \cdot 10^{-11}$.

Атропин в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$, добавленный в гомогенат, сам по себе не увеличивает существенно активности фосфорилазы, но препятствует

активации ее ацетилхолином. Прирост активности в этом случае при действии ацетилхолина в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ составляет всего 3,8%.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
24 XI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ B. Uvnas, *Physiol. Rev.*, **34**, 608 (1954). ² B. Uvnas, *Physiol. Rev.*, **40**, Suppl. 4, 263 (1960). ³ B. Folkow, B. Uvnas, *Acta physiol. scand.*, **15**, 389 (1948). ⁴ Н. А. Бердина, О. Л. Коленко и др., *Физиол. журн. СССР*, **57**, 546 (1971). ⁵ Н. А. Бердина, О. Л. Коленко и др., *ДАН*, **197**, 1218 (1971). ⁶ N. Berdina, D. Kolienko et al., *Circ. Res.*, **30**, 642 (1972). ⁷ Н. А. Бердина, И. М. Родионов, *Физиол. журн. СССР*, **59**, № 1, 75 (1973). ⁸ M. Hers, F. Hoof, *Methods in Enzymol.*, **8**, 525 (1966). ⁹ Н. П. Мешкова, С. Е. Северин, *Практикум по биохимии животных*, М., 1950, стр. 169. ¹⁰ Н. А. Плохинский, *Биометрия*, М., 1970, стр. 34. ¹¹ E. W. Sutherland, T. W. Rall, In: *Ciba Foundation Symposium on Adrenergic Mechanisms*, London, 1961, p. 295.