

Ф. Н. ГИЛЬМИЯРОВА, И. В. СИДОРЕНКОВ, Г. П. ЖОВНИР, П. А. КАЗАРЯН

РЕАКЦИЯ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА МОЗГОВОЙ ТКАНИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ НАГРУЗКЕ ГЛИЦЕРОФОСФАТОМ

Продолжительная нагрузка кроликов ГФ¹ сопровождается повышением содержания свободной глюкозы, снижением активности α -ГФД и 3-ФГАД, а также увеличением альдолазной активности мозговой ткани. Изменение концентраций α -ГФ и молочной кислоты не было обнаружено.

Являясь важным посредником между углеводным и жировым обменом, ГФ* при определенных условиях может образовываться из глюкозы и, наоборот, может использоваться для ее синтеза в печени [13].

Опытами было показано значение МИА в развитии атерогенного эффекта [4, 6], в увеличении уровня ГФ в тканях, в частности в мозговой [7], и угнетение активности 3-ФГАД в мышцах [1].

Учитывая особое значение состояния углеводного обмена для функциональной деятельности мозга, нами было предпринято изучение взаимосвязи обменов как самого ГФ, так и углеводов в ткани головного мозга кроликов с длительной нагрузкой ГФ.

Материал и методика. Исследования проводились на взрослых кроликах, которым в течение 5 месяцев с измельченными корнеплодами скармливали кальциевую соль α - и β -изомеров ГФ в дозе 200 мг/кг веса. Контролем служили 11 интактных кроликов. Животных лишали пищи за 12 час. до забоя с целью исключения возможного искажения показателей. После одномоментной декапитации и немедленного извлечения мозга часть его помещалась в жидкий азот, а другая часть, предназначенная для определения активности ферментов, измельчалась на холоду и растиралась в ступке в течение 20 мин с определенным количеством охлажденной дистиллированной воды, содержащей ЭДТА— $1 \cdot 10^{-3}$ М.

Концентрация ГФ определялась методом СИЭсио [12]. Инкубационная среда состояла из 2,65 мл гидразин-гидратного буфера (рН 9,8), 0,1 мл $1,3 \cdot 10^{-2}$ М НАД⁺, 0,2 мл нейтрализованного безбелкового супернатанта. Реакция начиналась с добавления 50 мкг кристаллической α -ГФД. О количестве α -ГФ судили по разности оптической плотности при 340 мкм за 15 мин. Для расчетов использовали коэффициент молярной экстинкции, равный $6,22 \cdot 10^{-6}$ см²/моль.

Количество глюкозы определялось глюкозооксидазным способом [2] с применением орто-дианизидина в качестве окисляющего хромогена и фтористого натрия как ингибитора гликолиза. Концентрация молочной кислоты также определялась фермента-

¹ Принятые сокращения: ГФ—глицерофосфат, МИА—монойодацетат, ДООФ—диоксиацетонфосфат, 3-ФГА—3-фосфоглицериновый альдегид, ФДФ—фруктозо-1-6-фосфат, НАД—никотинамидадениндинуклеотид, НАДФ—никотинамидадениндинуклеотид-фосфат, α -ГФД—дегидрогеназа α -глицерофосфата, 3-ФГАД—дегидрогеназа 3-фосфоглицеринового альдегида, ЛДГ—лактатдегидрогеназа, ЭДТА—этилендиаминтетраацетат.

тивным методом [14]. Альдолазная активность измерялась по методу Брунса в модификации Товарницкой [9].

Определение активности 3-ФГАД проводилось способом Варбурга [18] в инкубационной среде общим объемом 3 мл следующего состава: 0,05 М—трис буфер (рН 8,6), $5 \cdot 10^{-3}$ М арсенат натрия, $2 \cdot 10^{-2}$ М—3-ФГАД, $5 \cdot 10^{-4}$ М-НАД-.

α -ГФД мозговой ткани определялась по убыли оптической плотности при 340 мк за 1 мин в инкубационной среде общим объемом 3 мл, содержащей триэтаноламиновый буфер (рН 7,5) $5 \cdot 10^{-2}$ М, ДОАФ— $2,2 \cdot 10^{-5}$ М, НАД.Н— $1,35 \cdot 10^{-4}$ М [11].

Измерение ЛДГ активности [16] проводилось в инкубационной среде, состоящей из 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,5)—2,55 мл, пирувата 0,01 М—0,2 мл, НАД.Н $1,35 \cdot 10^{-4}$ М—0,1 мл, цианистого калия—0,2 М—0,1 мл.

Смесь фосфотриоз, необходимая для исследования активности α -ГФД и 3-ФГА, была получена ферментативным расщеплением ФДФ по Мейергофу [17]. Белок определялся биуретовым способом [10]. Результаты опытов были статистически обработаны по методу Монцевичюте-Эрингене [3].

Результаты и обсуждение. При определении концентрации α -ГФ, а также метаболитов начального и конечного путей гликолиза (табл. 1) обнаружено, что несмотря на длительную нагрузку сравнительно большими дозами ГФ содержание последнего в мозговой ткани даже несколько уменьшается. В то же время уровень глюкозы повышается на 35%, а содержание лактата остается без изменений.

Одновременное исследование α -ГФД и ряда гликолитических ферментов (табл. 2) показало, что длительное введение ГФ приводит к угнетению активности большинства исследуемых ферментов, особенно α -ГФД (—58%) и 3-ФГАД (—44%). Альдолазная активность, наоборот, повышается на 41%, а ЛДГ не претерпевает статистически достоверных изменений ($P=0,08$).

Таблица 1

Уровень компонентов углеводного обмена (мкм/г ткани) в мозговой ткани кроликов после 5-месячного скармливания им ГФ в дозе 200 мг/кг

Компоненты	Контроль (среднее из 10)	Опыт (среднее из 11)	Изменение, %
Глюкоза	0,68±0,03	0,92±0,08	+35
α -ГФ	1,4 ±0,25	1,3 ±0,09	— 8
Лактат	3,9 ±0,6	3,9 ±0,3	б/изменений

Таким образом, полученные результаты, несомненно, можно расценить как свидетельство своеобразного нарушения в системе обмена углеводов мозговой ткани. В отличие от других тканей особенность обмена на ткани головного мозга при длительной нагрузке ГФ заключается прежде всего в том, что количество самого α -ГФ, в противоположность ожидаемым результатам, несколько понижено. Видимо, в условиях наших опытов, при возросшем уровне глюкозы, часть вводимого ГФ использовалась для ее синтеза. С другой стороны, не исключено, что систематическое вскармливание ГФ приводит к торможению гликолиза и в результате этого к увеличению содержания глюкозы в мозге. Наконец, описанный эффект можно объяснить также конкуренцией за НАД в условиях проведенного эксперимента.

Таблица 2

Активность гликолитических ферментов мозговой ткани кроликов при длительном скармливании ГФ

Альдолаза — в ед. альдолазной активности; 3-ФГАД — в ед. прироста, α -ГФД и ЛДГ — в ед. убыли оптической плотности при 340 мк за 1 мин на 1 мг белка

Ферменты	Контроль (среднее из 10)	Опыт (среднее из 11)	Изменение, %	P
Альдолаза	57,97 \pm	81,97 \pm	+41	0,001
3-ФГАД	0,191 \pm 0,01	0,107 \pm 1,01	-41	0,0007
α -ГФД	0,139 \pm 0,0006	0,058 \pm 0,006	-58	0,0004
ЛДГ	0,77 \pm 0,05	0,66 \pm 0,08	-16	0,08

При анализе полученных данных обращает на себя внимание резкое угнетение ферментативной активности α -ГФД и 3-ФГАД, что казалось бы должно тормозить дальнейшее течение гликолитических процессов. Однако активность ЛДГ угнетается незначительно, а содержание молочной кислоты совершенно не изменяется по сравнению с контролем. Поэтому неизменное содержание лактата говорит или о нормальном течении процессов гликолиза в целом, или о возможном пополнении запасов молочной кислоты из пирувата не гликолитического происхождения.

С другой стороны, сочетание высокой активности альдолазы с пониженной активностью 3-ФГАД и α -ГФД свидетельствует о возможном образовании избыточных количеств фосфотриоз. Возникает вопрос об их реализации. Дальнейшее окисление 3-ФГА катализирует 3-ФГАД, которая, как было показано [15], зависит от двух коферментов, а именно от НАД⁺ и НАДФ. Это наводит на мысль о том, что дегидрогеназа 3-ФГА способна на ферментативную активность при использовании одного из двух коэнзимов. Так как в результате ингибирования α -ГФД, катализирующей реакцию превращения фосфотриоз в α -ГФ, меняется количественное соотношение окисленной и восстановленной форм НАД в пользу последней (НАДН₂) [8], можно предполагать использование фосфотриоз в пентозофосфатном цикле. Этот факт был обнаружен одним из соавторов [5]. Можно допустить, что активация апопомического пути окисления углеводов является дополнительным механизмом в использовании экзогенно вводимого ГФ для синтеза липоидов мозговой ткани.

Таким образом, все вышесказанное позволяет нам сделать заключение о способности мозговой ткани в условиях продолжительной нагрузки ГФ сохранять по возможности нормальный фон метаболических превращений, используя при этом свои широкие альтернативные пути обмена.

Куйбышевский медицинский институт им. Д. И. Ульянова,
кафедра биохимии
Институт биохимии АН АрмССР,
лаборатория биохимии липидов

Поступило 16.IV 1973 г.

Ֆ. Ն. ԳԻԼՄԻՅԱՐՈՎԱ, Ի. Վ. ՍԻՒՌԵՆԿՈՎ, Գ. Պ. ԺՈՎՆԻՐ, Պ. Ա. ՂԱԶԱՐՅԱՆ

ՈՒՂԵՂԱՅԻՆ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔԻ ԱԾԵԱԶՐԱՏԱՅԻՆ ՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՄԻ ՔԱՆԻ ԿՈՂՄԵՐ ԳԼԻՑԵՐՈՖՈՍՖԱՏՈՎ ԵՐԿԱՐԱՏԵՎ ԲԵՌՆԱՎՈՐՄԱՆ ԴԵՊՔՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ու մ

Հինգ ամսվա ընթացքում 200 մգ/կգ ղողայով զլիցերոֆոսֆատ կալցիումի պրեպարատ ստացած ճագարի ուղեղային հյուսվածքում ֆերմենտատիվ մեթոդով որոշվել է α -ԴՓ-ի, ազատ գլյուկոզայի և կաթնաթթվի քանակը, ինչպես նաև ուսումնասիրվել է ալդոլազայի, α -ԴՓԸ-ի- 3-ՓԴԱԸ-ի և ԼԸԴ-ի ակտիվությունը:

Հայտնաբերվել է α -ԴՓԸ-ի ակտիվության նվազում 58%-ով, 3-ՓԴԱԸ-ինը՝ 44%-ով այն դեպքում, երբ ալդոլազայի ակտիվությունը ավելացել է 41%-ով:

Գլյուկոզայի քանակը աճել է 35%-ով, α -ԴՓ-ի և կաթնաթթվի կոնցենտրացիան, ինչպես նաև ուղեղային հյուսվածքի ԼԸԴ-ի ակտիվությունը նըշված պայմաններում չեն փոխվել:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гильмиярова Ф. Н. Сб. Вопросы сердечно-сосудистой патологии в эксперименте, Куйбышев, 1970.
2. Инструкция по ферментативному (глюкозооксидазному) методу определения глюкозы в биологических жидкостях с применением кристаллического гемоглобина крупного рогатого скота вместо препарата пероксидазы. Институт биохимии АН УССР, 1964.
3. Монцевичуте-Эрингене Е. В. Пат. физиол., 14, 1964.
4. Сидоренков И. В. Сб. Биохимия и морфология экспериментального атеросклероза, ч. II, Куйбышев, 1965.
5. Сидоренков И. В., Колпакова Т. И. Вопр. мед. хим., 5, 13, 1967.
6. Сидоренков И. В. и др., Сб. Вопросы биохимии атеросклероза, Куйбышев, 1969.
7. Сидоренков И. В., Гильмиярова Ф. Н., Биохимия, 6, 34, 1969.
8. Тенишева З. Х. Сб. Вопросы биохимии атеросклероза, Куйбышев, 1969.
9. Товарницкий В. И. Современные методы в биохимии. М., 1964.
10. Beisenherz J., Boltze H. I., Bucher Th., Jarbade K. H., Meyer-Arenelt E., Pfeleiderer J. Z. Naturforsch., 8, 555, 1953.
11. Belsenherz J., Bucher Th., Jarbade K. H. Methods in Enzymol., Y., 1, 391, 1955.
12. Ciaccio E. I. Analit. Biochem., 3, 5, 396, 1962.
13. Frank A., Farquhar J. W., Reaven J. W. Metabolism, 7, 9, 776, 1968.
14. Hohorst H. I., Karentz F., H., Bucher Th. Biochem., 332, 18, 1959.
15. Hood W., Carr N. J. Biochem. Biophys. Acta, 146, 1, 309, 1967.
16. Kornberg A. Methods in Enzymol., 1, 441, 1955.
17. Meyerhof O. Bull. Soc. Chim. Biol., 20, 1033, 1938.
18. Warburg O., Christian W. Biochem. Z., 314, 149, 1943.