

Г. С. ХАЧАТРЯН, А. А. АКОПЯН

## АКТИВНОСТЬ ФРУКТОЗОДИФОСФАТАЛЬДОЛАЗЫ И ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИДФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В МОЗГЕ ПРИ ЕГО РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ

При пищевом и условнопищевом возбуждении происходит достоверное повышение активности фруктозодифосфатальдозы и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы в мозге. При условном торможении наступает понижение. Повышение активности ключевых ферментов гликолитического пути распада глюкозы при возбуждении, наряду с продукцией энергии, служит одним из основных механизмов образования пирувата в мозге для обеспечения ацетатом цитратного цикла, активность которого значительно повышается при указанном функциональном состоянии.

Осуществление нормальных физиологических функций головного мозга требует значительного использования глюкозы в качестве основного энергетического субстрата, доставляемого из кровяного русла и образующегося из гликогена, гликолипидов и некоторых аминокислот мозга в результате метаболических превращений. Метаболизм глюкозы в мозге, а также в других тканях, протекает различными путями, превалирование которых зависит от функционального состояния мозга и эффекторных органов [1, 5—7, 9, 14, 19, 26].

Несмотря на то, что обмену углеводов в мозге и в других органах посвящены многочисленные исследования, по ним имеются обзоры и монографии, вопросы биоэнергетики мозга, лимитирующей жизненные процессы, не сходят с арены биохимических исследований и дискуссий. Недостаточно исследованы, в частности, узловые этапы гликолитического, пентозофосфатного, глюкуроонатного и других путей обмена глюкозы и ее метаболитов в организме как в норме, так и в патологии. В настоящей работе ставится задача изучить активность двух важных ферментов гликолитического пути обмена глюкозы: фруктозо-1,6-дифосфат-D-глицеральдегид-3-фосфатлазы (4.1.2.13) и D-глицеральдегид-3-фосфат: НАД-оксидоредуктазы (фосфорилирующей) (1.2.1.12) в мозге при его различных функциональных состояниях, выработанных на базе натуральных рефлексов.

*Материал и методика.* Опыты ставили на белых крысах-самцах весом 130—150 г. Условный рефлекс вырабатывался по отставленному способу в условнорефлекторной камере УРК-66 [8], приспособленной для замораживания животных в жидком азоте. В нужный момент функциональной активности мозга (пищевое, условнопищевое возбуждение и условнопищевое торможение) крыс замораживали. Все последующие операции проводили в холодильной комнате при  $\pm 2^\circ\text{C}$ .

Фруктозодифосфатальдозу выделяли по методу Райкумара и др. [34]. Мозговую ткань, предварительно очищенную от крупных сосудов и оболочек, гомогенизировали

в трехкратном объеме охлажденного при 3°C 25% глицерола (pH 8,0), содержащего  $10^{-3}$  М ЭДТА, в гомогенизаторе Поттера-Эльвегейма в течение 60 сек при 3°C. Полученный гомогенат центрифугировали при 40000g и 0°C в течение 45 мин на ультрацентрифуге марки Spinco, L2 65K. Далее в контейнере из нержавеющей стали при -10°C проводили фракционирование надосадочной жидкости -45°C этанолом при pH 7,1 (концентрацию этанола в надосадочной жидкости довели до 48%) и после тридцатиминутного помешивания центрифугировали при 15000g и -6°C в течение 15 мин на центрифуге Janetzki K-24. Затем надосадочную жидкость повторно фракционировали 95% этанолом при -45°C и концентрацию этанола в ней довели до 60%. После помешивания содержимого пробы в течение тридцати минут при -10°C центрифугировали при 15000g и -6°C в течение 15 мин. Полученный осадок высушивали на фильтровальной бумаге в течение 2 мин для полного освобождения от этанола. Осадок растворяли в 0,01 М Трис-Cl буфере (pH 7,4), содержащем  $10^{-3}$  М ЭДТА, при -10°C и центрифугировали при 14600g и 0°C в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сохраняли, а осадок реэкстрагировали 0,01 М Трис-Cl буфером (pH 7,4), содержащем  $10^{-3}$  М ЭДТА. Собранную надосадочную жидкость подвергали тепловой обработке в присутствии 10% этанола в стальном контейнере при 40°C в течение 10 мин. После немедленного охлаждения до 2°C центрифугировали при 14600g и 0°C 10 мин. Надосадочную жидкость использовали для фракционирования на колонке целлюлозо-фосфата. На промытую колонку размером 40x13 мм и уравновешенную 0,01 М Трис-Cl буфером (pH 7,4), содержащим  $10^{-3}$  М ЭДТА, наносили фермент и сначала элюировали гемоглобин с помощью 0,05 М Трис-Cl буфера (pH 7,4) в присутствии 0,005 М ЭДТА. После выхода связанного гемоглобина (около 10% активной альдозазы обычно ассоциируется с ним) фермент элюировали 0,0025 М фруктозодифосфатом [32] в 0,033 М Трис-HCl буфере (pH 7,4), который мы получали с помощью перевода фруктозодифосфата бария во фруктозодифосфат натрия. Изучаемый нами фермент выходил в 45—47 фракциях 0,5 мл/мин по 3,5 мл в каждой фракции. Активность очищенного фермента определяли по методу Варбурга и Христиана [37] на спектромоме-202 при  $\lambda=340$  м $\mu$ . Инкубационная смесь состояла из 0,4 мл фруктозодифосфатаальдозазы, полученной из мозга крыс, 0,1 мл 0,0025 М фруктозодифосфата натрия (pH 7,6), 0,3 мл 0,034 М арсената натрия, 0,2 мл 0,001 М НАД, 0,3 мл 0,054 М глицина, 0,6 мл 0,02 М цистеина (pH 7,6), 0,1 мл глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, полученной нами из мышц кролика. Для выделения фермента размельчали мышцы спины и ног кролика, охлажденные при 2°C. Все последующие операции проводили по методике Аллисона, описанной ниже с проведением дальнейшей очистки [12]. На колонку с карбоксиметилцеллюлозой размером 250x15 мм, заполненную по Петерсону и Соберу и уравновешенную 0,02 М фосфатным буфером (pH 6,5), содержащим  $10^{-3}$  М ЭДТА и  $10^{-3}$  М  $\beta$ -меркаптоэтанол, наносили диализат, содержащий исследуемый нами фермент. Глицеральдегидфосфатдегидрогеназу элюировали тем же буфером, при котором гемоглобин адсорбировался. Фракции, в объеме по 3,5 мл в каждой, со скоростью 0,5 мл/мин, собирали на автоматическом коллекторе марки Mijet с охлаждающим устройством. Фермент выходил во фракциях 10—21 с максимумом его в 12-ой фракции. Собранный элюат диализировали в тридцатикратном объеме насыщенного при 23°C раствора сульфата аммония, содержащего  $10^{-3}$  М ЭДТА, и центрифугировали при 20000g и 0°C в течение 15 мин. Фермент сохраняли при -15°C в 0,02 М фосфатном буфере (pH 6,5) в присутствии  $10^{-3}$  М ЭДТА и  $10^{-3}$  М  $\beta$ -меркаптоэтанола.

За единицу активности фруктозодифосфатаальдозазы принимали то количество фермента, которое катализирует расщепление 1  $\mu$ М фруктозодифосфата в одну минуту при 28°C. Специфическую активность выражали числом единиц ферментативной активности на мг белка. Белок определяли спектрофотометрически по методу Лоури.

Глицеральдегидфосфатдегидрогеназу из мозга выделяли по методу Аллисона [12] с некоторой нашей модификацией. Ткань гомогенизировали в двукратном объеме охлажденного при 2°C  $10^{-3}$  М ЭДТА (pH 7,0), содержащего  $10^{-3}$  М  $\beta$ -меркаптоэтанола.

в гомогенизаторе Поттера-Эльвегейма, затем гомогенат оставляли при медленном помешивании на 2 часа. Полученную суспензию центрифугировали при 1200g и 0°C в течение 15 мин. Далее проводили двукратное фракционирование сульфатом аммония. К 100 мл надосадочной жидкости добавляли 47,2 г сульфата аммония и через час фильтровали мелкокладчатым фильтром, к фильтрату добавляли снова сульфат аммония из расчета 20 г на 100 мл фильтрата. Полученный белковый осадок оставляли на ночь при  $\pm 2^\circ\text{C}$ , затем растворяли в минимальном количестве 0,02 М фосфатного буфера (рН 6,5), содержащего  $10^{-3}$  М ЭДТА и  $10^{-3}$  М  $\beta$ -меркаптоэтанол и диализировали в тридцатикратном объеме того же буфера, меняя его дважды с десятичасовым интервалом. Диализат центрифугировали при 20000g и 0°C в течение 15 мин на ультрацентрифуге марки Spinco L2 65K, а затем определяли активность фермента по методу Варбурга и Христиана [37] на спектроме-202 при  $\lambda=340$  м $\mu$ . Конечная реакционная смесь в кювете состояла из 0,1 мл ферментного препарата, полученного из мозга крысы, 0,3 мл 0,034 М арсената натрия, 0,2 мл 0,001 М НАД, 0,1 мл 0,02 М глицеральдегидфосфата, 0,3 мл 0,054 М глицина (рН 8,4), 0,6 мл 0,02 М цистеина (рН 8,4). Общий объем реакционной смеси составлял 2,9 мл. В контрольную пробу после кипячения фермента добавляли субстрат.

Специфическую активность глицеральдегидфосфатдегидрогеназы выражали количеством восстановленного НАД в  $\mu\text{M}/\text{мг}$  белка/мин при  $25^\circ\text{C}$  в глицин-цистеиновом буфере (рН 8,4).

Использовали реактивы фирмы Sigma.

**Результаты и обсуждение.** Итоги наших исследований по изучению активности фруктозодифосфатаальдозазы и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы в мозге при его различных функциональных состояниях, выполненных на базе естественных физиологических воздействий, приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Активность фруктозодифосфатаальдозазы в мозге при его различных функциональных состояниях,  $\mu\text{M}$  фруктозодифосфата/мг белка/мин

Средние данные	Контроль	Пищевое возбуждение	Условнопищевое возбуждение	Условнопищевое торможение
$\frac{M \pm m}{n}$	$0,945 \pm 0,032$ 16	$1,21 \pm 0,053$ 12	$1,41 \pm 0,030$ 12	$0,545 \pm 0,040$ 8
$\pm$	$\pm 0,128$	$\pm 0,186$	$\pm 0,107$	$\pm 0,10$
p		$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$

Как показывают данные, представленные в табл. 1, активность фруктозодифосфатаальдозазы у подопытных крыс контрольной группы, по данным 16 опытов, составляет  $0,945 \pm 0,032$   $\mu\text{M}$  фруктозодифосфата/мг белка/мин. На этом фоне возбуждение ЦНС (как пищевое, так и условно-пищевое) вызывает достоверное повышение активности фруктозодифосфатаальдозазы в мозге. Таким образом, было показано, что возбуждение ЦНС, вызванное естественным физиологическим раздражителем, индуцирует активность фруктозодифосфатаальдозазы в мозге.

При торможении, как показывают данные таблицы, условнопищевое торможение вызвало значительное (почти вдвое) понижение активности фруктозодифосфатаальдозазы. Фруктозодифосфатаальдозазная реакция является одной из ключевых в гликолитическом распаде глюкозы в мозге. Полученные данные свидетельствуют о том, что при торможении ЦНС в мозге почти на 50% подавляется обмен глюкозы по этому пути.

Первоначально были выделены три изоэнзима фруктозодифосфатальдозы (А, В, С) из мышц и мозга [18, 23, 25, 31, 33 и др.] и описаны их свойства. В последующем в мозге морских свинок и быка были найдены и описаны пять изоэнзимов фруктозодифосфатальдозы [20, 27, 30, 35]. Активность изоэнзимов фруктозодифосфатальдозы в мозге при естественных физиологических воздействиях также представляет большой интерес и требует специального исследования.

Установив достоверное повышение активности фруктозодифосфатальдозы в мозге при возбуждении и значительное понижение ее при торможении, мы перешли к изучению сдвигов в активности глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, осуществляющей окисление глицеральдегидфосфата при тех же функциональных состояниях.

Как показывают данные табл. 2, активность глицеральдегидфосфатдегидрогеназы мозга у контрольной группы крыс составляет  $26,90 \pm 0,818$   $\mu\text{M}$  НАДН<sub>2</sub>/мг белка/мин. Величина активности ее в контрольных опытах согласуется с данными других исследователей [25].

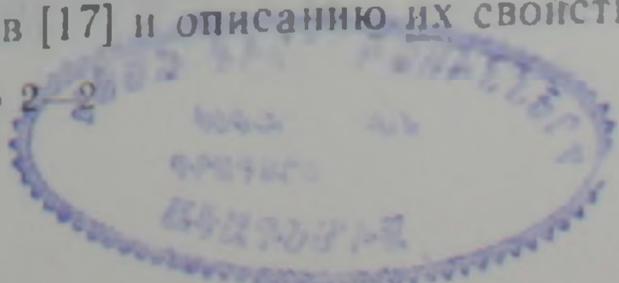
Таблица 2  
Активность глицеральдегидфосфатдегидрогеназы в мозге при его различных функциональных состояниях,  $\mu\text{M}$  НАДН<sub>2</sub>/мг белка/мин

Средние данные	Контроль	Пищевое возбуждение	Условнопищевое возбуждение	Условнопищевое торможение
$M \pm m$	$26,9 \pm 0,818$	$41,16 \pm 0,846$	$41,18 \pm 0,749$	$19,53 \pm 0,857$
$n$	28	12	10	10
$\sigma$	$\pm 1,33$	$\pm 2,93$	$\pm 2,36$	$\pm 2,70$
$p$		$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$

Как явствует из данных таблицы, пищевое и условнопищевое возбуждение вызывает значительное повышение активности глицеральдегидфосфатдегидрогеназы в мозге. Анализ полученных данных показывает, что повышение активности фермента в мозге, по сравнению с контролем, при обоих функциональных состояниях ЦНС почти одинаково.

При условнопищевом торможении отмечается значительное понижение активности глицеральдегидфосфатдегидрогеназы. Результаты этой серии опытов показывают, что при торможении условнопищевых рефлексов изменения в активности этого фермента протекают в противоположном направлении по сравнению с процессом коркового возбуждения, причем понижение активности фермента достоверно не только по отношению к фону возбуждения, но и уровню активности контрольных опытов. По данным 10 опытов, активность глицеральдегидфосфатдегидрогеназы составляла  $19,53 \pm 0,83$   $\mu\text{M}$  НАДН<sub>2</sub>/мг белка/мин.

Вопросы структуры, кинетики и сравнительных свойств глицеральдегидфосфатдегидрогеназы различного происхождения представлены в обзорах Аллисона и др. [4, 13]. Сделаны попытки выявить специфичность фермента для мозга [25], сердца [3], печени [28]. Проведена значительная работа по расшифровке первичной [22, 29] и высших структур фермента [17, 21], выявлению активных центров [17] и описанию их свойств [15, 16].



Изучались также аллостерические и кооперативные свойства его [24]. Раттер и др. [25] на аналитическом уровне выделили и изучили свойства глицеральдегидфосфатдегидрогеназы из мозговой и мышечной ткани кроликов.

На основании анализа полученных данных мы пришли к заключению, что при возбуждении мозга, индуцированном пищевым и условно-пищевым раздражением, когда имеет место повышение гексокиназной активности [2], усиленное поглощение глюкозы мозгом и интенсивное превращение в нем, а также нарастание количества пирувата и лактата в нервной ткани [9], происходит значительное повышение активности фруктозодифосфатальдозазы и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы в нем. Гликолитическая реакция в мозге при возбуждении, наряду с продукцией определенного количества энергии, служит также лимитирующим для последующего обеспечения цитратного цикла ацетатом, образующимся в результате окислительного декарбоксилирования пирувата. Подтверждением этому является значительное повышение активности цитратсинтазы в мозге при пищевом и условнопищевом возбуждении [11]. В результате внутриклеточной разобщенности в мозге параллельно могут протекать как гликолитический, так и «апотомический» и глюкуро-натный пути обмена глюкозы. При этом индуцирован и путь синтеза гликогена (свободный и связанный с белками) через уридилтрансферазную систему [10].

Ереванский медицинский институт,  
лаборатория биосинтетических  
реакций мозга

Поступило 3.IV 1974 г.

Գ. Ս. ԽԱԶԱՏՐՅԱՆ, Ա. Ա. ՀԱԿՈՔՅԱՆ

ՖՐՈՒԿՏՈՉԴՖՈՍՖԱՏԱԼԴՈՂԱԶԱՅԻ ԵՎ ԳԼԻՑԵՐԱԼԴԵԶԻԴՖՈՍՖԱՏԴԵԶԻԴՐՈՒ-  
ԳԵՆԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ՈՒՂԵՂՈՒՄ ՆՐԱ ՏԱՐԲԵՐ ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԿ  
ՎԻՃԱԿՆԵՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ֆրուկտոզոզիֆոսֆատալիզոլազայի և գլիցերալդեհիդֆոսֆատդեհիդրոգենազայի ակտիվությունը կոնտրոլ խմբի սպիտակ առնետների ուղեղում կազմում է համապատասխանաբար  $0,945 \pm 0,032 \mu\text{M}$  ֆրուկտոզոզիֆոսֆատ /մգ սպիտ./ թույն և  $26,9 \pm 0,818 \mu\text{M}$  նԱԴH<sub>2</sub> /մգ սպիտ./ թույն: Սննդային և պայմանական սննդային դրդման ժամանակ ուղեղում տեղի է ունենում ֆրուկտոզոզիֆոսֆատալիզոլազայի և գլիցերալդեհիդֆոսֆատդեհիդրոգենազայի ակտիվության ստույգ բարձրացում, ըստ որում նշված ֆերմենտների ակտիվությունը կազմում է համապատասխանաբար  $1,21 \pm 0,053$ ,  $1,41 \pm 0,030 \mu\text{M}$  ֆրուկտոզոզիֆոսֆատ /մգ սպիտ./ թույն և  $41,16 \pm 0,846$ ,  $41,18 \pm 0,749 \mu\text{M}$  նԱԴ H<sub>2</sub> /մգ սպիտ./ թույն: Պայմանական արդելակման ժամանակ տեղի է ունենում ֆրուկտոզոզիֆոսֆատալիզոլազայի և գլիցերալդեհիդֆոսֆատդեհիդրոգենազայի

ակտիվության անկում համապատասխանաբար մինչև  $0,545 \pm 0,04 \mu\text{M}$  ֆրուկտոզոֆոսֆատ /մգ սպիտ./ թույն և  $19,53 - 0,857 \mu\text{M}$  նևՆԴ  $\text{H}_2$  /մգ սպիտ./ թույն:

Դրդման ժամանակ գլիկոլիտիկ ճանապարհով գլյուկոզի քայքայման հանգուցային ֆերմենտների ակտիվության բարձրացումը, էներգիայի արտադրման հետ մեկտեղ, հանդիսանում է ուղեղում պիրուվատի առաջացման հիմնական մեխանիզմներից մեկը, որը անհրաժեշտ է ցիտրատային ցիկլը ացետոնով ապահովելու համար, ընդ որում վերջինիս ակտիվությունը նշված ֆունկցիոնալ վիճակում զգալիորեն բարձրանում է:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии нервной системы, 2, 93, 1957.
2. Бунятян Г. Х., Хачатрян Г. С. Вопросы биохимии, Ереван, 101, 1960.
3. Крюкова С. С., Наградова Н. К. и др. Биохимия, 34, 1223, 1969.
4. Наградова Н. К. Структура и функция ферментов, I, МГУ, 150, 1972.
5. Палладин А. В. Вопросы биохим. нервной системы. Киев, 1965.
6. Прохорова М. И., Тупикова З. И. Углеводный обмен в животн. и растит. организмах, АН СССР, 120, 1959.
7. Хайкина Б. И. Укр. биохим. журн. 29, 1, 275, 1957.
8. Хачатрян Г. С. и др. Мат-лы 43 отчет. сессии Мед. ин-та, 173, 1966.
9. Хачатрян Г. С. Биохимия головного мозга, Айзстан, 1967.
10. Хачатрян Г. С. и др. Вопросы мед. химии, 17, 6, 1972.
11. Хачатрян Г. С., Оганесян М. Х. Биологический журнал Армении, 27, 2, 52, 1974.
12. Allison W. T. Methods in Enzymology, 9, 210, 1966.
13. Allison W. S., Kaplan N. O. J. Biol. Chem., 239, 2140, 1970.
14. Balazs R. Carbohydrate Metabolism. In: Handbook of Neurochem., ed. A. Lajtha, 3, 1-29, 1970.
15. Boross L., Cseke E. Acta Bioch, Hung., 2, 47, 1967.
16. Chanke B., Park J. K. J. Biol. Chem., 242, 5093, 1967.
17. Colowick S. P. et al. Compr. Biochem., 14, 1, 1966.
18. Cotariu D., Serban M. Rev. roum. Biochim., 6, 1, 1969.
19. Coxon R. V. Glycogen Metabolism In Handbook of Neurochem. Ed. A. Lajtha, 3, 37, 1970.
20. Foxwell C. I. et al. Biochem, J., 100, 44, 1966.
21. Harrington W. F., Karr G. M. J. Mol. Biol., 13, 885, 1965.
22. Harriis J. I. et al., Nature, 198, 154, 1963.
23. Horecker B. L. et al. Biochem. Z., 338, 36, 1963.
24. Koshland, D. E. Jr. et al. The Regulation of Enzyme Activity and Allosteric Interactions, Universitetsvorlaget, Oslo, p. 133, 1968.
25. Kochman M., Rutter W. J. Biochemistry, 7, 1671, 1968.
26. Mc Ilwain. Biochemistry and the Central Nervous System, London, 1959.
27. Nicholas P. B., Bachelard H. S. Biochem. J., 112, 587, 1969.
28. Papadopoulos C. S., Veltck S. F. Fed. Proc., 26, 557, 1967.
29. Park J. H. a o. J. Biol. Chem., 236, 136, 1961.
30. Peanasky R. J., Lardy H. A. J. Biol. Chem., 233, 365, 1958.
31. Penhoet E. et al. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 56, 1275, 1966.
32. Pogell B. U. Biochem. and Biophys. Research. Comm., 7, 3, 1962.
33. Penhoet E. et al. Biochemistry, 8, 11, 1969.
34. Rajkumar T. V. et al. Methods in Enzymology, 9, 491, 1966.
35. Rensing W. et al. Hoppe-Seyl. Z., 348, 1001, 1967.
36. Shth Tsy Yang, Deal W. C. Biochemistry, 8, 2806, 1969.
37. Warburg O., Christian W. Biochem. Z., 314, 149, 1943.