

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ КЛЮЧЕВОГО ФЕРМЕНТА ГЕКСОЗОМОНОФΟΣФАТНОГО ШУНТА

Г. С. ХАЧАТРЯН, А. А. АКОПЯН, А. Р. КАЗАРЯН

Изучалась активность фермента, фракционированного сульфатом аммония при 40- и 60%-ном насыщении с последующей колоночной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе. Активность фермента достоверно повышается при возбуждении и падает при торможении ЦНС, выработанных на базе натуральных пищевых рефлексов. Величины активности фермента, определяемые в мозговой ткани, взятой при различных функциональных состояниях ЦНС, находятся в прямой зависимости от степени очистки.

Ключевые слова: глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, гексозомонофосфатный шунт.

Важнейшие аспекты биосинтетического обеспечения высших функций головного мозга в норме и патологии все еще остаются недостаточно разработанными. Открытие гексозомонофосфатного шунта (ГМШ) в некоторых тканях (надпочечники, молочная железа, мозг) [4, 5, 11, 13] дало основание предположить, что этот своеобразный путь обмена углеводов может играть важную роль в биосинтетических реакциях активно функционирующих клеток и тканей организма. Ранними исследованиями Хачатряна [5] была показана лимитирующая роль ГМШ в биосинтетических реакциях мозга при его различных функциональных состояниях. Показана взаимосвязь между интенсивностью ГМШ и целым рядом биосинтетических процессов [5, 18]. В настоящее время появились работы, указывающие на наличие активных форм фермента, кроме цитоплазмы и других клеточных структур: в ядрах [3], митохондриях [2], микросомах [14]. Характерно, что в мозге, где имеется значительное количество митохондриальной формы глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, микросомальный фермент отсутствует. Предполагают, что наличие активных митохондриальных форм глюкозо-6-фосфат- и 6-фосфоглюконатдегидрогеназ имеет большое значение при образовании НАДФН для восстановительных реакций [10, 19].

В развитие этих исследований изучалась активность одного из ключевых ферментов ГМШ—глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (1.1.1.49 D-глюкозо-6-фосфат: НАДФ⁺-1 оксидоредуктаза), фракционированной из мозга собак на различных этапах ее очистки при различных функциональных состояниях ЦНС.

Материал и методика. Опыты ставили на собаках-самцах массой 4—5 кг. Функциональные состояния мозга вырабатывали условнорефлекторным методом [5]. В нужный момент функциональной активности мозга (пищевое, условнорефлекторное пище-

вое возбуждение и условнорефлекторное пищевое торможение) животных замораживали в жидком азоте. Последующие операции проводили в холодильной комнате при $\pm 2^{\circ}$. Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу из мозга собак выделяли по методу Бессела и Томаса [9]. Мозговую ткань, предварительно очищенную от крупных сосудов и оболочек, гомогенизировали в четырехкратном объеме холодного раствора 1,2% KCl в течение 2 мин, затем центрифугировали при 100000 g в течение 60 мин на центрифуге VAC-601. Далее с помощью 0,5 M уксусной кислоты pH надосадочной жидкости доводили до 4,5, а после центрифугирования при 3000 g в течение 30 мин—до 7,5, с помощью 0,1 N NaOH. Полученную после центрифугирования при 3000 g в течение 30 мин надосадочную жидкость фракционировали дважды сульфатом аммония (40, 60% насыщения), затем осадок растворяли в минимальном количестве 0,01 M трис-HCl буфера, pH 7,5, и анализировали в том же буфере в течение 24 часов. Диализованную жидкость использовали для фракционирования на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. На колонку размером 20x45 мм, промытую и уравновешенную 0,01 M трис-HCl буфером, содержащим 0,1 m M НАДФ⁺, наносили пробу. Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу элюировали линейной градиентной элюцией (50 мл 0,01 M трис-HCl буфера, pH 7,5, содержащего 0,1 мл M НАДФ⁺, и равный объем 0,01 M трис-HCl буфера, содержащего 0,5 M KCl и 0,1 мл M НАДФ⁺, pH 7,5). Изучаемый фермент выходил в 5—6-й фракциях со скоростью 0,5 мл/мин (объем фракций—3,5 мл).

Активность очищенного фермента определяли по методу Лангдона [16] на спектрофотометре-202 при λ 340 нм. С этой целью собирали систему, состоящую из 0,1 мл глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, полученной из мозга собак, 0,2 мл 0,002 M НАДФ⁻, 0,1 мл 0,025 M глюкозо-6-фосфата, 0,1 мл 1N трис-HCl буфера, pH 7,5, 0,1 мл 0,2 M MgCl₂·6 H₂O. За единицу активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы принимали то количество фермента, которое катализировало реакцию восстановления 1 мкM НАДФ в минуту при 25° в трис-HCl буфере, pH 7,5. Количество белка определяли по методу Кристиана-Варбурга при длине волны 278 нм [17]. Удельную активность фермента выражали числом единиц ферментативной активности на мг белка.

Результаты и обсуждение. Как показывают данные табл. 1, в результате очистки активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы повышается в 141 раз (табл. 1).

Результаты изучения активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в мозге собак при его различных функциональных состояниях, разрабо-

Таблица 1
Этапы очистки и удельная активность глюкозо-6-фосфат—
—дегидрогеназы из мозга собак

Э т а п ы	Удельная активность, мкM НАДФН/мг белка/мин
Гомогенат	0,0170
40%-ный аммоний сульфатный осадок	0,067
60%-ный аммоний сульфатный надосадок	0,074
До колонки	0,107
ДЭАЭ-целлюлозные фракции	2,4

танных на базе естественных физиологических воздействий, приведены в табл. 2, из которой видно, что активность фермента в мозге у контрольной группы собак составляет $1,49 \pm 0,093$ мкM НАДФН/мг белка/мин;

при пищевом и условнорефлекторном пищевом возбуждении она повышается и составляет $1,93 \pm 0,240$ и $2,85 \pm 0,081$ мкМ НАДФН/мг белка/мин соответственно; при этом при условнорефлекторном пищевом возбуждении активность фермента повышается на 47,6%. На фоне значительного повышения активности фермента при возбуждении мы проследили за изменением активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы при торможении. Анализ полученных данных показывает, что условнорефлекторное пищевое торможение вызывает значительное понижение активности фермента, она составляет, по средним данным 4-х опытов, $1,07 \pm 0,05$ мкМ НАДФН/мг белка/мин.

Таблица 2

Активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в мозге собак,
мкМ НАДФН/мг белка/мин

Контроль	Пищевое возбуждение	Условнорефлекторное пищевое возбуждение	Условнорефлекторное пищевое торможение
$M \pm m$ 1,49 \pm 0,093	1,93 \pm 0,240	2,85 \pm 0,081	1,07 \pm 0,05
n 3	3	3	4
σ \pm 0,161	\pm 0,141	\pm 0,140	\pm 0,102
p	>0,05	<0,01	<0,001

Основное значение ГМШ—снабжение клеток животных и растений фосфорилированными сахарами и восстановительными эквивалентами. Образование пентозофосфатов, которые служат составной частью нуклеотидов и нуклеиновых кислот, а также никотинамидных и флавиновых коферментов, является центральным звеном в превращениях глюкозы [15]. Поэтому синтез нуклеиновых кислот, а следовательно, и белков, находится в тесной связи с интенсивностью ГМШ.

Восстановленный в ходе окислительных реакций ГМШ НАДФ используется для биосинтеза многих строительных белков и физиологически важных метаболитов: пуриновых и пиримидиновых оснований—предшественников нуклеиновых кислот, при биосинтезе и гидроксильровании аминокислот (моногеназная реакция), восстановительном аминировании α -кетоглутарата; он необходим также для биосинтеза стероидных гормонов, C_4 -кислот трикарбонового цикла Кребса, а также других веществ, представленных в большом количестве в головном мозге. Рассматривая литературные данные относительно механизма образования НАДФН в животных тканях [7, 12, 20] и сопоставляя их с нашими данными, приходим к убеждению о возможном участии в этом процессе трех важных ферментов: глюкозо-6-фосфат-, 6-фосфоглюконат- и изоцитратдегидрогеназ. Известно, что возбуждение и торможение мозговой деятельности сопровождаются затратой энергии. Повышение активности ферментов гликолитического распада глюкозы [6], трикарбонового цикла Кребса, в особенности цитратсинтазы, НАДФ-специфической изоцитратдегидрогеназы [7], а также глюкозо-6-фосфат- и 6-фосфоглюконатдегидрогеназ [5] свидетельствует о том, что ГМШ

играет существенно важную роль в биосинтетических реакциях мозговой деятельности.

Наши исследования показывают, что при торможении ЦНС в мозге доля ГМШ значительно падает, несмотря на превалирование многих анаболических процессов над катаболическими. И эту важную функцию биосинтетического обеспечения мозга необходимым количеством восстановительных эквивалентов при торможении ЦНС выполняют НАДФ-зависимые малат- и изоцитратдегидрогеназы, активность которых при этом значительно возрастает [7].

Повышение активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в мозге при возбуждении ЦНС говорит о том, что она принимает непосредственное участие в использовании энергии и продуцировании НАДФН, необходимого в биосинтетических реакциях мозга при указанном функциональном состоянии—возбуждении. Подъем активности НАДФ-зависимых малат- и изоцитратдегидрогеназ в мозге при условнорефлекторном торможении, установленный Хачатряном и Оганесян [7], свидетельствует о возможном функционировании малатного челнока в мозге, в особенности при торможении ЦНС, когда активность ключевых дегидрогеназ ГМШ подавляется.

Параллельное течение различных путей обмена углеводов и их переключение в мозге при его различных функциональных состояниях является следствием аллостерических взаимоотношений, индуцированных возбуждательными и тормозными процессами.

Ереванский государственный медицинский институт,

НИИ биосинтетических реакций мозга

Поступило 3.VII 1981 г.

ՀԵՔՍՈՉՄՈՆՈՖՈՍՖՈՍՖՈՍՖՈՒՆԻ ՇՈՒՆԹԻ ՀԱՆԿՈՒՑԱՅԻՆ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՈՒՄԸ

Գ. Ս. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Ա. Ա. ՀԱՌՈՔՅԱՆ, Ա. Ռ. ԿԱԶԱՐՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է ամոնիումի սուլֆատի 40 և 60% հագեցվածության պայմաններում անշտոված ֆերմենտի ֆրակցիաների ակտիվությունը և նրան հաջորդող ԳԵԱՆ՝ ցելյուլոզայի վրա սյունային բրոմատոգրաֆիայով: Ֆերմենտի ակտիվությունը հավաստի բարձրանում է բնական սննդային ռեֆլեքսների հիման վրա մշակված Կ. Ն. Հ. դրդման և ընկնում է վերջինիս արգելակման ժամանակ: Կ. Ն. Հ. տարբեր ֆունկցիոնալ վիճակներում ուղեղային հյուսվածքում որոշվող ֆերմենտի ակտիվության մեծությունը ուղիղ համեմատական է մաքրման աստիճանին:

REGULATION OF THE ACTIVITY OF KEY ENZYMES OF HEXOSEMONOPHOSPHATE SHUNT

G. S. KHACHATRIAN, A. A. HAKOPIAN, A. R. KAZARIAN

The activity of enzyme fractionated with ammonium sulfate at 40 and 60% saturation with following column chromatography on DEAE-cel-

lulose has been studied. The activity of enzyme increases under stimulation and decreases under inhibition of CNS, treated on the basis of natural food reflexes. The values of enzyme activity being determined in brain tissue under the various functional states of CNS are in direct dependence with purification degree.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Баев В. И. Тез. докл. 5-го Гродненск. симп., 139—140, 1979.
2. Гулая Н. М. Укр. биохим. журн., 47, 341—346, 1975.
3. Зиберт Г. Тр. V Междунар. биохим. конгр., 102—109, М., 1962.
4. Северин С. Е. Химические основы процессов жизнедеятельности. 174, М., 1962.
5. Хачатрян Г. С. Биохимия головного мозга. Ереван, 1967.
6. Хачатрян Г. С., Акопян А. А. Биолог. ж. Армении, 28, 14—19, 1975.
7. Хачатрян Г. С., Оганесян М. Х. Тез. докл. 5-го Гродненск. симп., 138—139, 1979.
8. Хмельницкий Ю. В., Зоназдра Н. Н. Тез. докл. 5-го Гродненск. симп., 139—140, 1979.
9. Besell E. M., Thomas P. Biochem. J., 131, 83—89, 1973.
10. Billar R. B. Little. Biochim. biophys. acta, 187, 243—249, 1969.
11. Dickens F. Proc. 3rd Intern. Congr. Biochem., 170, 1955.
12. Eggleston L. V., Krebs H. A. Biochem., J., 133, 2, 425—435, 1974.
13. Horecker B. L., Mehler A. H. Rev. Biochem., 24, 207, 1955.
14. Hori S., Sado Y. J. Fac. Sci., 19, 3, 315—319, 1974.
15. Katz J., Wals P. Biochem., J., 128, 879—899, 1972.
16. Langdon R. C. Methods in Enzymology, 9, 126, 1966.
17. Layne E. Methods in Enzymology, 3, 447, 1957.
18. Poll K., Vande W. FEBS Lett, 32, 1, 33—34, 1973.
19. Quagliariello E. et al. Biochim. biophys. acta, 164, 12—23, 1968.
20. Rudack D., Holtzen D. J. Biol. Chem., 250, 10, 3960—3966, 1975.

