

Г. С. ХАЧАТРЯН, М. Х. ОГАНЕСЯН

ЦИТРАТСИНТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В МОЗГЕ ПРИ ЕСТЕСТВЕННЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Изучалась цитратсинтазная активность в головном мозге белых крыс в норме (интактные крысы) и при различных функциональных состояниях (пищевое возбуждение, условно-пищевое возбуждение, условно-пищевое торможение).

Результаты исследований показали, что активность цитрат-синтазы в мозге крыс контрольной группы составляет $3,19 \pm 0,08$ μM цитрата/мг белка в минуту. При пищевом и условно-пищевом возбуждении она превышает уровень контроля в 2,6 и 1,6 раза и составляет соответственно $8,0 \pm 0,94$ и $4,81 \pm 0,08$ μM цитрата/мг белка в минуту. При условно-пищевом торможении этот показатель падает по сравнению с контролем в 1,5 раза и составляет $2,1 \pm 0,21$ μM цитрата/мг белка в минуту.

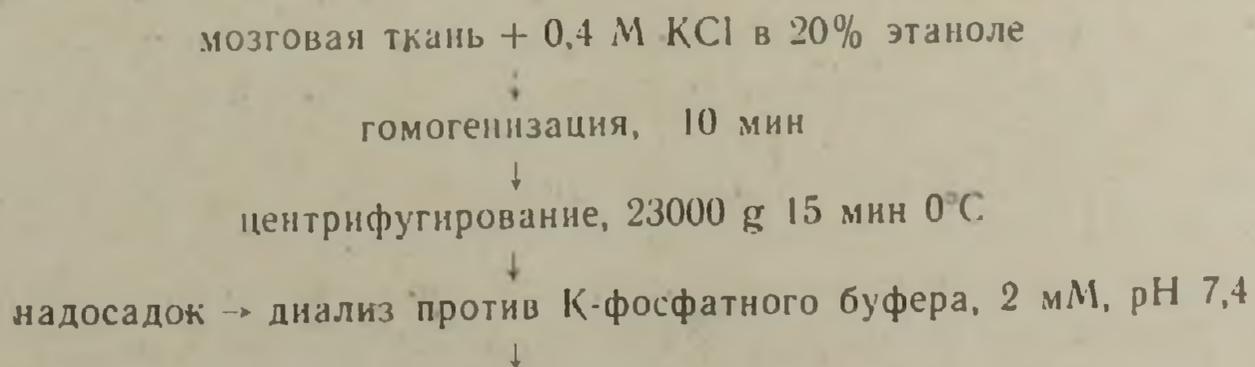
Многочисленными исследователями изучены различные аспекты энергетического обмена мозговой и других тканей [1—9, 11, 13, 14, 17—19, 21, 23, 31, 32, 34]. Однако интенсивность течения реакций цикла Кребса [27, 28], являющегося основным энергетическим узлом, обеспечивающим биосинтез АТФ, необходимого для протекания многих биохимических реакций в организме при различных воздействиях на него, изучена недостаточно. Реакции цикла трикарбоновых кислот, преимущественно протекающие в митохондриях клеток, служат основным механизмом окисления продуктов промежуточного обмена углеводов, жиров, белков. С другой стороны, цикл трикарбоновых кислот поставляет ди- и трикарбоновые кислоты, НАДФН₂, участвующие в биосинтезе углеводов, липидов, аминокислот, а через последних—пуриновых, пиримидиновых оснований, порфиринов и других веществ. Реакция, катализируемая цитрат-синтазой в тканях организма, является ключевой в пути биосинтеза основных ингредиентов трикарбонового цикла Кребса. Интенсивность течения этой реакции в мозге под влиянием естественных физиологических воздействий на организм не изучена.

Нами была поставлена задача изучить цитратсинтазную активность в мозге при его различных функциональных состояниях, выработанных на базе натуральных пищевых рефлексов.

Материал и методика. Исследования проводились на белых крысах-самцах весом 130—150 г, содержащихся на строгом смешанном пищевом рационе, условнорефлекторным методом [13], в четырех сериях экспериментов (контроль—интактные крысы, пищевое возбуждение, условно-пищевое возбуждение и условно-пищевое торможение). Условный рефлекс вырабатывался по отставленному способу. В качестве безусловного раздражителя служило кормление крыс сахарозой из расчета 0,4—0,5 г на 100 г веса. Данное количество сахарозы на 30 мин после дачи вызывало повышение уровня глю-

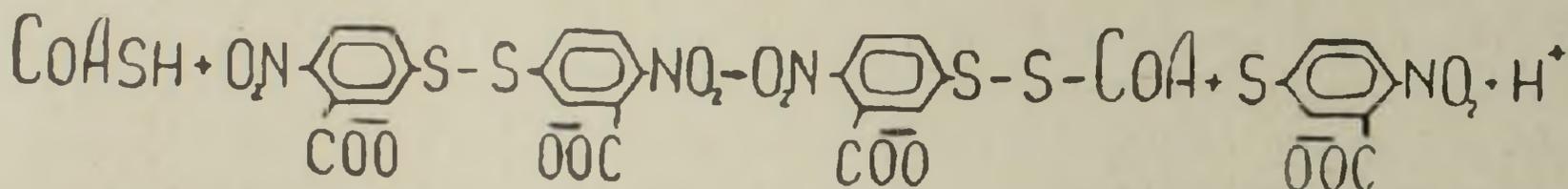
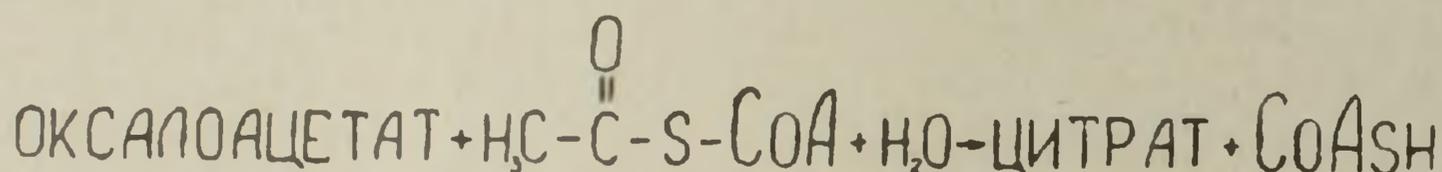
kozy в крови в пределах физиологических колебаний (20—25 мг%) и служило тестом для определения пищевого или условно-пищевого возбуждения [10]. В качестве условного раздражителя служило звучание зуммера. Торможение положительного условного рефлекса вырабатывалось методом угашения. О функциональном состоянии мозга судили по поведению животных в условнорефлекторной камере. Подопытные крысы всех серий экспериментов подвергались замораживанию в жидком азоте в условнорефлекторной камере [15], приспособленной к условиям замораживания экспериментальных животных в нужный момент функциональной активности мозга.

Выделение, очистка и определение активности цитрат-синтазы КФ 4.1.3.7 цитрат-оксалоацетат-лиаза (ацетилирующая-КоА). После замораживания животного в жидком азоте головной мозг извлекали в холодильной комнате при 0°C и отделяли его от оболочек и крупных сосудов с целью выделения и очистки цитрат-синтазы по методу Срира [36] в модификации Жангард и др. [24]. К мозговой ткани добавляли 0,4 М КСl в 20% этаноле в четырехкратном объеме и гомогенизировали 10 мин при —10°C в гомогенизаторе Поттер-Эльвегейма в модификации Пиерса. Гомогенат центрифугировали при 23000 g 15 мин при 0°C на ультрацентрифуге «Вескман», надосадочную жидкость диализировали против восьмидесятикратного объема охлажденного 2 мМ калий фосфатного буфера (рН 7,4) в течение 4 часов с однократной сменой омывающего буфера через 2 часа. Диализат центрифугировали при 23000 g 15 мин 0°C. Осадок отбрасывали. К надосадочной жидкости медленно добавляли аммоний сульфат из расчета 31,3 г на 100 мл надосадочной жидкости (50% насыщение), смесь оставляли на 30 мин. Осадок удаляли после центрифугирования при 23000 g 15 мин 0°C. К надосадочной жидкости медленно добавляли аммоний сульфат из расчета 13,5 г на 100 мл для получения 70% насыщения и подвергали центрифугированию при 23000 g 15 мин 0°C. Осадок растворяли в минимальном количестве воды при 0°C и диализировали против стократного объема охлажденного 1 мМ калий фосфатного буфера (рН 7,0) в течение ночи при 0°C. Диализат наносили на ДЭАЭ-целлюлозную колонку размером 35×100 мм, заполненную под давлением (0,5 кг/см²) [33] и заранее уравновешенную 1 мМ калий фосфатным буфером (рН 7,0). Цитрат-синтазу элюировали с колонки линейной градиентной элюцией. Линейный градиент получали с помощью двух одинаковых сосудов, установленных на одном уровне и соединенных трубкой для поддержания гидростатического равновесия. Одна из сосудов заполняли 0,5 М КСl в 10 мМ калий фосфатного буфера (рН 8,0), а другой—смеситель—заполняли равным объемом 1 мМ калий фосфатного буфера (рН 7,0). Элюаты с цитратсинтазной активностью, 5 мл фракциями собирали в коллекторе марки «Müfem» с охлаждающей системой. К объединенным элюатам добавляли кальций фосфатную гель, приготовленную по Кайлин и др. [25] из расчета 5 мл гели (17 мг/мл) на 100 мл элюата. Смесь элюатов с кальций фосфатной гелью оставляли на ночь при 0°C, гель осаждали декантированием с последующим центрифугированием при 2500 g 15 мин 0°C на центрифуге «Janetzki K-24». Элюцию с кальций фосфатной гели проводили дважды 50% насыщенным раствором аммоний сульфата, нейтрализованного до рН 7,4 с последующим центрифугированием при 2500 g 15 мин 0°C. К объединенным элюатам добавляли аммоний сульфат из расчета 13,5 г на 100 мл (70% насыщение). Смесь оставляли на 30 мин и центрифугировали при 23000 g 15 мин 0°C. Полученный осадок растворяли в минимальном количестве охлажденного 0,1 М калий фосфатного буфера, рН 7,4. Схема выделения и очистки цитрат-синтазы приведена ниже:



↓
 центрифугирование, 23000 g 15 мин 0°C
 ↓
 I фракционирование сульфатом аммония
 ↓
 надосадок → II фракционирование сульфатом аммония
 ↓
 диализ против воды
 ↓
 хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе
 ↓
 адсорбция на Са-фосфатной гели
 ↓
 центрифугирование, 23000 g 15 мин 0°C
 ↓
 фракционирование сульфатом аммония
 ↓
 осадок + 0,1 М К-фосфатный буфер, pH 7,4

В полученном ферментном растворе определяли активность цитрат-синтазы по методу Срира и др. [37], основанному на химическом связывании КоАШН, освобождающе-



**5,5' ДИТИБИС-(2-НИТРОБЕНЗОЕВАЯ
 КИСЛОТА) ДТНБ**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ CoASH РЕАКТИВОМ ЭЛМАНА

гося из ацетил-S-CoA при ферментативном синтезе цитрата с реактивом Элмана [20]: 5,5'-дитиобис (2-нитробензойная кислота) (ДТНБ) (рис.). Реакция прослеживается спектрофотометрически при λ 412 нм. Реакционная смесь в 1 см кювете содержала 2,6 мл 0,1 М трис-Cl буфера (pH 8,0), 10 μ л 50 мМ оксалоацетата, предварительно нейтрализованного KOH до pH 7,5, 20 μ л, 10 мМ реактива Элмана (ДТНБ), 20 μ л 5 мМ ацетил-S-CoA, приготовленного согласно методу Срира [36], 0,05 мл ферментного раствора. Реакция начиналась добавлением цитрат-синтазы и протекала при 25°C в термостатированной кювете. Контрольный опыт не содержал фермента. Применялись реактивы фирмы «Sigma».

За единицу ферментативной активности принимали то количество цитрат-синтазы, которое катализировало синтез 1 микромоля в минуту при 25°C.

Специфическую активность определяли числом единиц ферментативной активности на мг белка (количество белка определяли по методу Лоури) [30].

Результаты и обсуждение. Результаты исследований приведены в таблице.

Т а б л и ц а

Активность цитрат-синтазы в мозге при действии естественных физиологических раздражителей

Средние данные	Контроль	Пищевое возбуждение	Условно-пищевое возбуждение	Условно-пищевое торможение
$M \pm m$	$3,19 \pm 0,08$	$8,0 \pm 0,94$	$4,81 \pm 0,08$	$2,1 \pm 0,21$
n	$\frac{12}{12}$	$\frac{8}{8}$	$\frac{12}{12}$	$\frac{12}{12}$
σ	$\pm 0,297$	$\pm 2,677$	$\pm 0,271$	$\pm 0,731$
P	—	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$

Как видно из таблицы, активность цитрат-синтазы в головном мозге у контрольной группы крыс, по средним данным, составляет $3,19 \pm 0,08$ μ М цитрата на мг белка/мин.

При пищевом возбуждении активность цитрат-синтазы значительно повышается и составляет $8,0 \pm 0,94$ μ М цитрата на мг белка/мин. При условно-пищевом возбуждении также наблюдается достоверное повышение активности цитрат-синтазы, она составляет $4,81 \pm 0,08$ μ М цитрата на мг белка/мин. Анализ полученных данных показывает, что цитратсингазная активность в мозге при возбуждательном процессе превышает уровень контроля в 2,6 (пищевое возбуждение) и 1,6 (условно-пищевое возбуждение) раза.

Изучение метаболической роли цитрата и цитратного цикла в мозге при его различных функциональных состояниях представляет большой интерес в аспекте раскрытия биоэнергетических и биосинтетических основ высших функций головного мозга.

Конкретное изучение параметров этого важного энергетического цикла в биоэнергетическом обеспечении функций активно действующих органов стало возможным благодаря работам Срира [38], посвященным очищению и изучению свойств трех основных ферментов (цитрат-синтаза, КФ 4.1.3.7, цитрат расщепляющий фермент, КФ 4.1.3.8, цитритаза, КФ 4.1.3.6), катализирующих реакции обмена цитрата. Эткинсон [16] показал роль цитрата и цитратного цикла в регуляции энергетического обмена. Показано также влияние АТФ, пальмитил-карнитина на биосинтез цитрата и митохондриальный контроль различных метаболитов при окислении пальмитил-карнитина в ацето-ацетат [22]. Ловенштейн [29] изучил переход цитрата в жиры. Цитрат как метаболический регулятор в мышечной и жировой тканях представлен в исследованиях Рандл и др. [35]. Метаболический контроль в митохондриях с транслокацией адениннуклеотидов показан в работах Клингенберга и др. [26].

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что пищевое и условно-пищевое возбуждение индуцирует реакции активации цитрат-синтазы, приводя к значительному увеличению содержания цитрата и, по-видимому, к повышению метаболической активности всего цитратно-

го цикла. Не исключено, что головной мозг, который при пищевом и условно-пищевом возбуждении максимально снабжается энергетическими веществами [10], в результате аллостерических эффектов (индуцирования и ингибирования) осуществляет координацию и регуляцию основных физиологических функций организма. При этом цитратный цикл ответствен в основном за биоэнергетическое обеспечение активно протекающих физиологических процессов.

На фоне выявленной нами закономерности значительного повышения активности ключевого фермента цитратного цикла при возбуждении особый интерес представляло изучение активности фермента в мозге при торможении условного пищевого рефлекса. Как показывают данные таблицы, условно-пищевое торможение вызывает достоверное понижение активности цитрат-синтазы по сравнению с контролем, она составляет $2,1 \pm 0,21$ μM цитрата на мг белка/мин. При сопоставлении с данными опытов с пищевым и условно-пищевым возбуждением активность цитрат-синтазы уменьшается в 4 и 2 раза соответственно. Значительное падение этого показателя в мозге при торможении мозговой деятельности находится в прямой связи с понижением скорости мозгового кровотока (данные изотопного обмена) и уменьшением поглощения кислорода и глюкозы мозгом при корковом торможении [10], при котором в мозге увеличивается содержание свободной эндогенной глюкозы и глутамата [12]. По всей вероятности, из-за пониженной активности цитратного цикла и уменьшения поглощения кислорода мозгом при торможении многие мегаболиты не утилизируются в пути катаболизма, а, напротив, расходуются на биосинтетические процессы.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о значительном изменении цитратсинтазной активности в зависимости от функционального состояния мозга. Возбуждение мозговой деятельности требует больших затрат энергии. Повышение активности цитрат-синтазы, ключевого фермента в пути синтеза членов трикарбонового цикла при пищевом и условно-пищевом возбуждениях указывает на увеличение интенсивности реакций цикла Кребса в пути синтеза макроэргических соединений. С другой стороны, повышение активности цитрат-синтазы при возбуждении дает основание считать, что происходит активирование реакций биосинтеза C_4 и C_6 аминокислот—необходимых компонентов биополимеров и макромолекулярных соединений нервной ткани.

Ереванский медицинский институт,
лаборатория биосинтетических реакций мозга
и кафедра биохимии

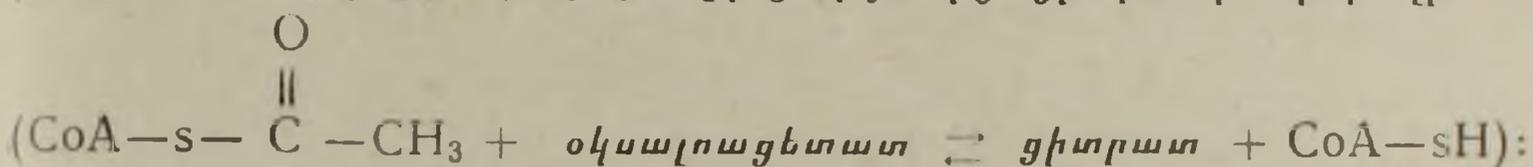
Поступило 7.V 1973 г.

Գ. Ս. ԿԱԶԱՏՐՅԱՆ, Մ. Խ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

ՑԻՏՐԱՏ-ՍԻՆԹԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ՈՒՂԵՂՈՒՄ ԲՆԱԿԱՆ ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԱԶԻՇՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԳԵՊՔՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է ցիտրատ-սինթազայի ակտիվությունը սպիտակ առնետների գլխուղեղում՝ նորմայում (կոնտրոլ խումբ) և բնական ֆիզիոլոգիական գրգիռների ազդեցության տակ: Ցիտրատ-սինթազան անջատվել ու մաքրվել է Սրիլի մեթոդով, ժանգարդի մոդիֆիկացիայով: Ցիտրատ-սինթազայի ակտիվությունը որոշվել է սպեկտրաֆոտոմետրիկ եղանակով՝ մերկապտիդ իոնի միջոցով, որը առաջանում է ԿոԱ-SH-ի և էլմանի ռեակտիվի (5,5 դիթիոբիս (2-նիտրոբենզոյաթթու) փոխազդեցությունից ցիտրատի սինթեզի ժամանակ



Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ սննդային և պայմանական-սննդային դրդման ժամանակ ցիտրատ-սինթազայի ակտիվությունը գլխուղեղում համապատասխանաբար 2,6 և 1,6 անգամ գերազանցում է կոնտրոլ փորձերի մակարդակը, իսկ պայմանական-սննդային արգելակման ժամանակ ֆերմենտի ակտիվությունը կոնտրոլի համեմատ իջնում է 1,5 անգամ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бунятян Г. Х. Handbook of Neurochemistry, Plenum Press, N. Y.—London, 3, 1970.
2. Гаевская М. С. Биохимия мозга при умирании и оживлении организма. М., 1963.
3. Дёмин Н. Н., Нечаева Г. А., Певзнер Л. З. В сб. Гормоны и головной мозг. Киев, 1968.
4. Крепс Е. М., Смирнов А. А., Четвериков Д. А. Биохимия нервной системы. Киев, 1954.
5. Мхоян Э. Е. III Всесоюзн. конф. по биох. нервн. сист., Ереван, 409, 1963.
6. Палладин А. В. Биохимия нервной системы. Киев, 1954.
7. Промыслов М. Ш. Вопросы биохимии нервной системы. Киев, 1957.
8. Прохорова М. И. В сб. Нервная система, 1, 24, 1960.
9. Северин С. Е. Сб. Химические основы процессов жизнедеятельности, 156, 1962.
10. Хачатрян Г. С. Изв. АН АрмССР (биол. и с/х науки), 10, 6, 1957.
11. Хачатрян Г. С. V Международн. конгр. биохимиков, рефераты, М., 1, 457, 1961.
12. Хачатрян Г. С. Тр. Ер. мед. ин-та, 13, 83, 1963.
13. Хачатрян Г. С. Биохимия головного мозга. Ереван, 1967.
14. Хачатрян Г. С. 7th Inter. Congr. Biochem., Tokio, 1967.
15. Хачатрян Г. С. Мат-лы XLIII отчетн. научн. сессии мед. ин-та, Ереван, 1966.
16. Atkinson D. E. Proc. Biochem. Soc. Symp., Acad. Press, 27, 23, 1968.
17. Balazs R. Handbook of Neurochemistry, Plenum Press, N. Y.—London, 3, 1970.
18. Coxon R. V. Handbook of Neurochemistry, Plenum Press, N. Y.—London, 3, 1970.
19. D'Adamo A. F. Handbook of Neurochemistry, Plenum Press, N. Y.—London, 3, 1970.
20. Elmann G. L. Arch. Biochem. a. Biophys., 82, 70, 1959.
21. Gaitonde M. K. Handbook of Neurochemistry, Plenum Press, N. Y.—London, 3, 1970.
22. Garland P. B. Proc. Biochem. Soc. Symp., Acad. Press, 27, 41, 1968.

23. *Guroff G., Lovenberg W.* Handbook of Neurochemistry, Plenum Press, N. Y.—London, 3, 1970.
24. *Jangaard N. O., Unkeless D., Atkinson E.* Biochem. et Biophys. Acta. 1, 225, 1968.
25. *Keilin D., Hartree E. F.* Proc. Roy. Soc. London, B 124, 397, 1938.
26. *Klingenberg M., Pfaff E.* Proc. Biochem. Soc. Symp., Acad. Press, 27, 105, 1968.
27. *Krebs H. A.* The Tricarboxylic Acid Cycle, Harvey Lectures, 1948.
28. *Krebs H. A.* The Tricarboxylic Acid Cycle, 1954.
29. *Lowenstein J. M.* Proc. Biochem. Soc. Symp., Acad. Press, 27, 61, 1968.
30. *Lowry O. H., Rosebrough N. J.* Biol. Chem., 193, 265, 1951.
31. *McIlwain H.* Biochemistry and the Central Nervous System. London, 1966.
32. *Moore C. L., Strasberg P. M.* Handbook of Neurochemistry. Plenum Press, 3, 1970
33. *Peterson E., Sober H.* In: Methods in Enzymology., 5, 3, 1962.
34. *Radin N. S.* Handbook of Neurochemistry, Plenum Press, N. Y.—London, 3, 1970.
35. *Randle P. J., Denton R. M., England P. J.* Proc. Biochem. Soc. Symp., Acad. Press, 27, 87, 1968.
36. *Srere P. A.* In: Methods in Enzymology., 13, 3, 1969.
37. *Srere P. A., Brazil H., Gonen L.* Acta Chem. Scand., 17, 129, 1965,
38. *Srere P. A.* Proc. Biochem. Soc. Symp., Acad. Press, 27, 11, 1968.