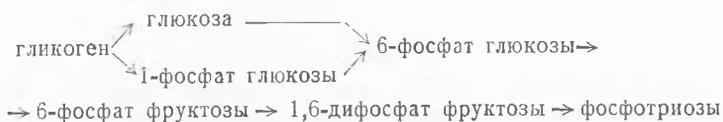


Б. Н. СТЕПАНЕНКО и Е. А. СИЛАЕВА

К ИЗУЧЕНИЮ СВОЙСТВ 1,6-ДИФОСФАТА ФРУКТОЗЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 8 VII 1949)

Как было показано одним из нас (1,2), замещение остатками фосфорной кислоты атомов водорода спиртовых гидроксильных в молекуле простого сахара способствует его дециклизации. Было показано далее, что первые стадии гликолиза, состоящие в превращении:



можно представить как единый процесс непрерывно идущей дециклизации, как бы подготавливающей постепенно молекулу гексозы к расщеплению на 2 молекулы фосфотриозы.

В биологических условиях 1,6-дифосфат фруктозы, как известно, под влиянием фермента альдолазы расщепляется легко. Однако большой интерес представляло получение прямых доказательств понижения прочности связи между 3-м и 4-м атомами углерода в молекуле фосфорилированной гексозы в отсутствие действия специализированного фермента — альдолазы.

Наряду с изучением „неспецифического“ расщепления 1,6-дифосфата фруктозы нас интересовало также изучение его биологического действия, так как имеющиеся в этом отношении сведения далеко не соответствуют биологическому значению этого вещества. Намеченной работе предшествовала разработка метода получения препарата 1,6-дифосфата фруктозы, более удобного для исследований, чем описанные в литературе. Известные в литературе препараты солей 1,6-дифосфата фруктозы (серебряной (3), кальциевой (4), бариевой (4), магниевой (4), свинцовой (4) и стрихнинной (5)) либо очень плохо растворимы в воде, либо содержат катион, делающий их непригодными для биологического испытания.

С этой точки зрения мы остановились на разработке метода получения препарата натриевой соли. Биохимики довольно широко применяют водные растворы этой соли, но сухие препараты ее не описаны. В настоящее время водные растворы натриевой соли получают обычно путем реакции обмена бариевой соли 1,6-дифосфата фруктозы с Na_2SO_4 . Однако, по данным наших опытов, вследствие плохой растворимости бариевой соли 1,6-дифосфата фруктозы можно быть уверенным в окончании такого разложения лишь после встряхивания смеси в течение 24 час. при 0°; кроме того, водные растворы натриевой соли крайне нестойки, что делает длительную работу с ними еще более неудобной.

Метод получения сухого препарата натриевой соли 1,6-дифосфата фруктозы, разработанный нами, сводится к следующему. Бариевая соль 1,6-дифосфата фруктозы, полученная и очищенная по Нейбергу и Кобель (4), анализируется на содержание влаги (высушивание в вакууме над P_2O_5 при 40°), бария и фосфора (обычно наш препарат содержал не менее 98% бариевой соли при расчете на сухой вес). Точная навеска препарата бариевой соли вносится в 10-кратное количество воды, к смеси добавляется высчитанное и точно взвешенное эквивалентное количество сульфата натрия. Суспензия встряхивается при температуре 0° в течение 24 час., $BaSO_4$ отфуговывается, остатки его отфильтровываются. К фильтрату, полностью свободному как от ионов Ba^{++} , так и SO_4^{--} (это нужно каждый раз контролировать), прибавляется 2-кратный объем спирта. Натриевую соль, выпадающую в виде хлопьев* после нескольких часов стояния, нужно очень быстро отсосать (при замедлении последней продукции соль расплывается на фильтре в виде липкого сиропа). Осадок, быстро снятый с фильтра, нужно поместить в вакуум-эксикатор с P_2O_5 . Натриевая соль 1,6-дифосфата фруктозы представляет собой желтовато-белый или желтый порошок, крайне гигроскопичный. После высушивания она без разложения может храниться в герметически закупоренной склянке. Препарат очень легко растворим в воде и очень плохо растворим в обычных органических растворителях. Легко восстанавливает фелингов раствор и дает реакцию Селиванова $[\alpha]_D^{25} = +2,79^\circ$.

Для сравнительного изучения расщепления фруктозы и 1,6-дифосфата фруктозы мы стремились выбрать такой метод неспецифического расщепления, при котором главными продуктами являются вещества с 3 атомами углерода, так как такое расщепление можно считать в известной степени аналогичным биологическому расщеплению дифосфата фруктозы. Как известно, таким расщеплением является расщепление сахаров в щелочной среде, при котором главным продуктом является молочная кислота (6,7).

За образованием молочной кислоты из расщепляемых сахаров мы следили, отбирая пробы, осаждая в них неразложившиеся сахара при помощи $Ca(OH)_2$ и $CaSO_4$ и далее определяя молочную кислоту по методу Фридемана, Котонио и Шеффера (8). В некоторых пробах молочная кислота определялась нами для проверки параллельно весовым путем, после извлечения пробы в специальном экстракторе (9), в виде кристаллического лактата цинка. При расщеплении нами свободной фруктозы и 1,6-дифосфата фруктозы в 5N и 2N КОН (при 60°) образование молочной кислоты происходило с приблизительно одинаковой скоростью, что объясняется быстрым гидролизом в этих условиях фосфатных остатков, вследствие чего в обоих опытах фактически расщепляется фруктоза. Эти опыты подтверждают данные Эванса (7), который работал с кандиолином (кальциевой солью 1,6-дифосфата фруктозы), плохо растворимым в воде. При расщеплении в более мягких условиях (в 0,1N КОН и буферных смесях $pH = 13$ и $pH = 11$) мы получили иные результаты, представленные некоторыми опытами в табл. 1.

Как видно из табл. 1, хотя расщепление в слабой щелочи и буферных растворах идет и не совсем тождественно, во всех опытах отчетливо видна следующая закономерность: количество молочной кислоты, образовавшейся из 1,6-дифосфата в начале опыта, приблизительно в 3 раза больше количества молочной кислоты, образовавшейся

* При недостаточной чистоте исходной бариевой соли, а также отклонениях от описанной процедуры, в частности, обычно после концентрирования (в вакууме), вместо выпадения хлопьев происходит образование эмульсии, иногда трудно разделяющейся.

из свободной фруктозы; к концу опыта, вследствие заметного идущего гидролиза фосфатных групп, эта разница в первых трех опытах несколько уменьшается, но все же цифры молочной кислоты в опытах с дифосфатом фруктозы остаются приблизительно в 2 раза более высокими, чем в опытах со свободной фруктозой. Особый интерес представляет опыт 4, в котором при крайне мягких условиях ($pH=11$, соотв. $0,001 N$ щелочи), когда расщепления свободной фруктозы обнаружить не удается, 1,6-дифосфат фруктозы расщепляется заметным образом.

Механизм действия щелочей на сахара очень сложен. Не ставя своей задачей его изучение в данной работе, мы, как упоминалось выше, опирались на основной хорошо известный факт, что при щелочном расщеплении сахаров молочная кислота, обладающая трехуглеродной цепью, является главным продуктом такого разложения. Таким образом, нам удалось получить прямые доказательства того, что сильно дециклизованный 1,6-дифосфат фруктозы гораздо легче расщепляется на трехуглеродные цепи, чем свободная фруктоза.

Условия наших опытов расщепления сахаров были далеки от таковых в случае расщепления их альдозазой. Тем не менее, некоторые факты, касающиеся альдозазы, интересно сопоставить с найденными нами фактами. Так, оптимум действия альдозазы лежит при $pH=9$, т. е. в щелочной области. Далее, здесь следует вспомнить данные Бреслера, который, проводя под давлением ресинтез некоторых ферментов, именно в случае альдозазы (в отличие от опытов с другими ферментами) получал значительное восстановление ферментативной активности. Это можно истолковать как следствие сравнительно простой структуры той химической группировки, которая обуславливает действие этого фермента. Представление о простоте строения

Таблица 1

Расщепление фруктозы и 1,6-дифосфата фруктозы в $0,1 N$ КОН и буферных растворах

№№ опытов	Количество сахара в опыте в сантимол.	Условия расщепления	Время взятия проб в час.	Количество образовавшейся молочной кислоты в пробе в мг из	
				фруктозы	1,6-дифосфата фруктозы
1	0,5	0,1 N КОН	1	0,33	1,12
			24	1,21	2,6
2	0,5	0,1 N КОН	4	0,58	1,53
			9	0,81	2,07
			48	0,72	1,75
3	0,5	Буферный раствор, $pH=13$	4	0,31	1,39
			9	0,85	1,53
			24	0,72	2,1
			48	0,9	1,84
4	0,5	Буферный раствор, $pH=11$	4	0,09	0,13
			9	0,09	0,13
			24	0,09	0,45
			48	0,09	0,58

этой группы кажется заманчивым сопоставить с элементарно простыми условиями расщепления дифосфата фруктозы в наших опытах. С другой стороны, обнаруженная нами большая легкость расщепления дифосфата фруктозы является наглядным примером возникшей в процессе эво-

люции „специализации“ органических веществ (не только ферментативной, но и неферментативной природы), лежащих на пути важных биохимических превращений.

В связи с важной ролью фосфорилированных углеводов в механизме расщепления углеводов при мышечном сокращении мы совместно с П. Ф. Минаевым провели сравнительное испытание биологической активности некоторых свободных и фосфорилированных сахаров на сокращение цельной мышцы лягушки*. Испытываемые глюкоза, фруктоза, пиро- и ортофосфат натрия, синтетический 6-фосфат глюкозы** и 1,6-дифосфат фруктозы сами не вызывали сокращений *m. rectus abdominis* лягушки. После предварительного воздействия глюкозы, фруктозы, пиро- и ортофосфата натрия в концентрации 10^{-4} действие ацетилхолина давало такую же высоту сокращения мышцы, как и без предварительного воздействия на мышцу одного из этих четырех веществ. Если же мышца предварительно обрабатывалась раствором натриевых солей 6-фосфата глюкозы или 1,6-дифосфата фруктозы, то в этих случаях при действии ацетилхолина сокращение мышцы было равно 109% (для 6-фосфата глюкозы) и 143,7% (для 1,6-дифосфата фруктозы), если за 100% принять высоту сокращения мышцы, вызванного одним ацетилхолином. Небольшое увеличение концентрации 1,6-дифосфата (до $4 \cdot 10^{-4}$) давало уже увеличение сокращения до 179% (техника физиологических экспериментов описана в другом месте⁽¹¹⁾).

Если учесть, что молекулярный вес фосфорилированных сахаров гораздо выше, чем свободных, то вызываемый фосфорилированными сахарами эффект надо признать еще более значительным.

Эти опыты не дают, естественно, сколько-нибудь ясных указаний на механизм усиления мышечного сокращения под влиянием фосфорилированных углеводов. Однако сам по себе факт усиления сокращения мышцы в 1,5 и более раза под влиянием 1,6-дифосфата фруктозы представляет большой интерес.

Предположительно его можно пока истолковать следующим образом. Главным источником мышечного сокращения в конечном итоге является потенциальная энергия углеводов. Если мышца получает крайне легко распадающийся промежуточный продукт обмена, каковым является 1,6-дифосфат фруктозы, то это должно получить отражение в ускорении всей длинной цепи химических превращений в мышце, внешним проявлением чего может явиться усиление мышечного сокращения.

Московский фармацевтический институт
Министерства здравоохранения СССР и
Лаборатория физиологической химии
Академии наук СССР

Поступило
27 V 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. Н. Степаненко, «Активные формы» простых сахаров и их отношение к обмену углеводов, М., 1945. ² А. В. Степанов и Б. Н. Степаненко, Биохимия, 5, 567 (1940). ³ W. J. Young, Proc. Roy. Soc. London, (13), 81, 533 (1909). ⁴ K. Neuberger u. M. Kobel, Oppenheimer's Fermente u. ihre Wirkung, 3, 1929, S. 406. ⁵ K. Neuberger u. O. Dalmer, Biochem. Zs., 131, 188 (1922). ⁶ Толленс-Эльснер, Кратк. справочник по химии углеводов, 1938, стр. 13. ⁷ W. Evans and R. Hockett, Journ. Am. Chem. Soc., 52, 4065 (1930). ⁸ T. E. Friedeman, M. Cotonio and P. A. Schaeffer, Journ. biol. Chem., 73, 335 (1927). ⁹ W. Evans and R. Hartmann, Journ. Am. Chem. Soc., 49, 2665 (1927). ¹⁰ O. A. Levene and A. L. Raupold, Journ. biol. Chem., 92, 757 (1931). ¹¹ Б. Н. Степаненко, П. Ф. Минаев и Е. А. Силаева, Булл. эксп. биол. и мед., 25, 188 (1948).

* Биологическое испытание производилось в физиологической лаборатории Института биохимии Академии медицинских наук СССР.

** 6-фосфат глюкозы мы синтезировали по Левину и Раймонду⁽¹⁰⁾ через ацетонсоединения глюкозы.