

Э. М. МИКАЕЛЯН, В. Г. МХИТАРЯН

ИЗМЕНЕНИЯ ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗНОЙ И ГЛУТАМИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ МОЗГА ПРИ ХЛОРОПРЕНОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

В предыдущей работе нами было найдено, что при хроническом хлоропреновом отравлении резко увеличивается уровень аммиака в мозгу [7]. Причем это увеличение сопровождается уменьшением количества глутамина. Учитывая, что в условиях физиологической нервной деятельности процессы синтеза глутамина преобладают над его распадом [3, 5, 16], мы предположили, что при хлоропреновой интоксикации наступает нарушение нормальных процессов устранения и образования аммиака либо в сторону усиления распада глутамина, либо — ослабления его синтеза.

Для разрешения этого вопроса мы изучили активность глутаминсинтетазы и глутаминазы при этой интоксикации. Глутаминсинтетаза — фермент, осуществляющий синтез глутамина из глутаминовой кислоты и аммиака. Реакция протекает в присутствии АТФ, как источника энергии и ионов магния или марганца.

По данным Ач, Балаж и Шрауба [2], синтез глутамина является одним из самых интенсивных процессов, протекающих в нервной клетке. В активном центре глутаминсинтетазы существенную роль играют сульфгидрильные группы и поэтому при их окислении, а также при связывании ионами металлов или алкилирующими веществами происходит ингибирование ферментативной активности [10, 11]. Оптимум pH для действия мозговой глутаминсинтетазы равен 7,2, т. е. близок к физиологическому pH.

Механизм синтеза глутамина пока еще точно не установлен. Так, Эллиот [10] предполагает, что вначале глутаминовая кислота активируется АТФ с образованием глутамилфосфата. Затем его фосфорный остаток замещается на аммиак с образованием глутамина и свободного фосфата.

Ряд авторов полагает, что вначале активируется фермент путем присоединения АТФ к сульфгидральным группам. Затем фосфорилированный фермент взаимодействует с глутаминовой кислотой с образованием комплекса: фермент-S-глутаминовая кислота. В этом комплексе глутаминовая кислота амидируется с образованием глутамина [17]. По данным Мейстера [12], глутаминсинтетазная активность тесно связана с трансферазой.

Глутаминаза дезамидирует глутамин с образованием аммиака и глутаминовой кислоты. Она активируется фосфатами, арсенатами и сульфатами. Этот фермент в литературе часто обозначается как глута-

миназа I в отличие от глутаминазы II, активируемой пируватом. Работами Вэльша было показано, что глутаминаза II идентична трансаминазе, описанной Мейстером, осуществляющей перенос аминоксиппы глутамина на α -кетокислоты с последующим отщеплением аммиака из амидной группы глутамина [13]. Оптимум активности глутаминазы рН 8—9. Следовательно, при физиологических рН она мало активна.

По мнению Сейре [14], в активном центре глутаминазы содержатся две катионные и одна сульфгидрильная группы. Причём ферментативная реакция осуществляется путем образования комплекса фермента, фосфатного иона и субстрата (глутамина). Соответственно с этим ингибиторы глутаминазы делятся на 3 типа: а) сульфгидрильные—сулема, параклормеркурийбензоат, йодоацетамид; б) конкурирующие с фосфатом—бромсульфалеин и флавиновая кислота; в) конкурирующие с глутамином—глутаминовая кислота и аммиак. В работах Палладина [8] показано, что глутаминазная активность сосредоточена в митохондриях.

Экспериментальная часть. Экспериментальными животными были белые крысы весом 150—200 г. Они отравлялись хлоропреном ингаляционно-динамическим методом, при концентрации паров хлоропрена в камере 4 мг/л с ежедневной экспозицией 2 часа. Сроки отравления 30, 60, 90 дней. По окончании срока затравки, животных убивали замораживанием в жидком воздухе. Головной мозг растирали до тонкого порошка в ступке в среде жидкого воздуха. Для определения глутаминсинтетазы использован метод, описанный Эллиотом [10] и З. С. Гершеновичем [4], с некоторой нашей модификацией. Фермент экстрагировали встряхиванием в шюттель аппарата в течение 2 часов при 0—4°C. Для экстракции брали навеску тонкого порошка мозга, растертого с десятикратным объемом холодной дистиллированной воды. Реакционная смесь содержала 1 мл фермента (соответствует 200 мг мозга), 100 мкмоль глутамата натрия, 40 мкмоль солянокислого гидроксилamina, 40 мкмоль $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 20 мкмоль цистеина, 10 мкмоль АТФ—Na и 0,5 мл буфера ТРИС рН 7,4. Общий объем пробы 3 мл. Контрольная проба содержала все те же компоненты, кроме глутаминовой кислоты. Все растворы предварительно нейтрализовали.

Пробы инкубировали 30 мин. при 37°. Реакцию останавливали добавлением 2 мл осаждающего реактива (5,05 г трихлоруксусной кислоты, 6 г $FeCl_3$ и 2,5 мл концентрированной HCl , вода до 110 мл), отфильтровывали и спектрофотометрировали через 30 мин., на СФ-4А на волне 540 мкм. Результаты выражали в мкмольях глутамилгидроксамовой кислоты, синтезируемой 1 г ткани за 30 мин.

Стандартную кривую строили по сукцинилгидроксамовой кислоте, образующейся в результате взаимодействия ангидрита янтарной кислоты и гидроксилamina. Для определения глутаминазной активности навеску мозга гомогенизировали в 25-кратном объеме фосфатного буфера рН 8,0, размешивали и разводили тем же буфером до концентрации 1 : 100. Реакционная смесь складывалась с 1 мл разведенного гомогената, 1 мл 0,01 М раствора глутамина (1,5 мг) и 1 мл фосфатного буфера

pH 8,0. Инкубация продолжалась в течение 15 мин. при температуре 37°C, после чего реакцию останавливали добавлением 1 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты. Для каждой пробы ставили контрольные определения, которые давали возможность судить о содержании аммиака в глутамине, в гомогенате и в реактивах. Пробы центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли аммиак микродиффузионным методом Зелингсона [15] в модификации А. И. Силаковой и сотр. [9]. Активность глутаминазы выражали количеством мг азота аммиака, выделяемого 1 г ткани, в результате дезамидирования глутамина в течение 15 мин. при 37°.

Полученные результаты и их обсуждение. Как видно из табл. 1, активность глутаминсинтетазы при сроке затравки в 30 дней уменьшается на 21% по сравнению с контролем. Удлинение срока затравки до 60 дней вызывает более глубокое угнетение ее активности, снижается на 49% по сравнению с контролем.

Таблица 1

Изменения активности глутаминсинтетазы в различные сроки хлоропренового отравления (активность глутаминсинтетазы выражена в мкмольх глутамилгидроксамовой кислоты, синтезируемой 1 г ткани за 30 мин. при 37°C)

	Контроль	О п ы т ы					
		30 дней	% уменьшения	60 дней	% уменьшения	90 дней	% увеличения
$M \pm m$	$1,575 \pm 0,06$ (n=13)	$1,256 \pm 0,05$ (n=11)	21	$0,804 \pm 0,07$ (n=11)	49	$1,773 \pm 0,08$ (n=10)	12
Пределы колебаний	2,0—1,25	1,1—0,9		1,1—0,3		2,25—1,35	
σ	0,22	0,18 P<0,001		0,25 P<0,001		0,29 P>0,05	

При сроке отравления в 90 дней отмечается восстановление ферментативной активности, даже с наклоном к повышению (увеличивается на 12% по отношению к контролю). Сравнивая данные об активности глутаминсинтетазы с уровнем глутамина в мозгу белых крыс в одни и те же сроки хлоропреновой интоксикации, приходим к заключению, что в их изменениях имеется параллелизм.

Уменьшение активности глутаминсинтетазы сопровождается уменьшением количества глутамина. Причем наиболее глубокое угнетение фермента синтеза глутамина при сроке отравления в 60 дней сопровождается наибольшим уменьшением количества последнего. по сравнению с другими сроками. Это дало нам возможность заключить, что при хлоропреновой интоксикации нарушаются процессы устранения аммиака путем подавления синтеза глутамина. Угнетение ферментативной реакции мы объясняем окислением перекисями хлоропрена тиоловых групп активного центра глутаминсинтетазы.

Это представление основано на исследованиях В. Г. Мхитаряна [6], в которых было доказано, что в основном токсическое действие хлоропрена на организм обусловлено его перекисями. Последние способствуют окислению в организме весьма важных, легко окисляемых соединений, в том числе ферментов, в активном центре которых существенную роль играют сульфгидрильные группы.

К 90 дню отравления отмечается некоторое приспособление животных к воздействию яда. На первый взгляд на этой стадии отравления имеется несоответствие в изменениях активности глутаминсинтетазы и количества глутамин. Глутаминсинтетазная активность, как уже говорилось выше, возвращаясь к норме, имеет наклонность к увеличению, в то время как уровень глутамин, возрастая по сравнению с 60 днем отравления, остается еще низким по сравнению с контролем.

Данное противоречие мы объясняем неполным совпадением условий нашего опыта с теми условиями, которые имеются *in vivo* в организме.

Определяя ферментативную активность, мы создаем максимально оптимальные условия для действия фермента, добавляя в инкубационную среду нужное количество субстрата, ионов Mg и АТФ. В результате нарушения энергетического обмена [1] в мозгу животных в это время создается, видимо, некоторый избыток АДФ и недостаток АТФ. Аденозиндифосфат же является мощным ингибитором глутаминсинтетазы, вступающим в конкурентное торможение с АТФ.

Учитывая, что активный центр глутаминсинтетазы также содержит сульфгидрильные группы, можно предположить, что при хлоропреновой интоксикации ее активность должна понижаться.

Наши исследования показали (табл. 2), что глутаминсинтетазная активность изменяется только при сроке затравки в 60 дней, когда уменьшается на 31 %, при сроках же 30 и 90 дней уровень ее приближается к контрольному.

Т а б л и ц а 2

Изменения активности глутаминсинтетазы в мозгу белых крыс в различные сроки хлоропреновой интоксикации (активность глутаминсинтетазы выражена в мг азота аммиака, выделенного 1 г ткани из глутамин в течение 15 мин., при 37°C)

	Контроль	О п ы т ы			
		30 дней	60 дней	% уменьшения	90 дней
$M \pm m$	$3,65 \pm 0,1$ ($n=14$)	$3,54 \pm 0,12$ ($n=12$)	$2,46 \pm 0,15$ ($n=12$)	31	$3,27 \pm 0,12$ ($n=12$)
Пределы колебаний	4,6—2	4,16—2,52	3,29—1,6		4,2—2,82
ϵ	0,76	$P > 0,05$	$0,51$ $P < 0,001$		$0,42$ $P > 0,05$

Сравнительно низкая чувствительность глутаминсинтетазы, чем глутаминсинтетазы, к воздействию хлоропрена объясняется, по-видимому, конформационными особенностями ее макромолекулы. По всей вероятности,

СН-группы ее активного центра располагаются более глубоко. Как уже указывалось, для образования фермент-субстратного комплекса необходимо еще наличие катионных групп и ионов фосфора. Эти же компоненты, наверное, более резистентны к хлоропрену.

В ы в о д ы

1. Хроническая хлоропреновая интоксикация вызывает понижение активности глутаминсинтетазы при сроке отравления в 30 дней на 21%, 60 дней—49%. К 90 дню отравления отмечается тенденция к ее повышению.

2. Глутаминазная активность при этих же условиях изменяется только при 60-дневном отравлении, понижаясь на 31%.

3. Наибольшие изменения активности обоих ферментов приходится на 60 день отравления. К 90 дню интоксикации отмечается привыкание организма к воздействию яда.

Ереванский медицинский институт,
кафедра биохимии

Поступило 13.X 1966 г.

Է. Մ. ՄԻՔԱՅԵԼՅԱՆ, Վ. Գ. ՄԽԻԹԱԲՅԱՆ

ԳԼՈՒՄԻՆԱՅԻՆՍԻՆԹԵՏԱԶԱՅԻ ԵՎ ԳԼՈՒՄԱՄԻՆԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ
ՓԱՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՔԼՈՐՊՐԵՆԱՅԻՆ ԹՈՒՆԱՎՈՐՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ

Ա մ փ ո փ ու լ մ

Տվյալ աշխատության նպատակն է եղել պարզել զխտլեղի գլուտամինսինթետազայի և գլուտամինազային ակտիվության փոփոխությունները քլորոպրենային քրոնիկ թունավորման ժամանակ:

Փորձերը դրվել են երեք խումբ առնետների վրա, որոնք թունավորման են ենթարկվել 30, 60 և 90 օր, օրական 2 ժամ՝ հատուկ կամերայում, որտեղ քլորոպրենի կոնցենտրացիան օդում եղել է 8 մգ/լ:

Ստացված տվյալները հիմք են տալիս անելու հետևյալ եզրակացությունները:

1. Քլորոպրենային թունավորման 30-րդ օրը գլուտամինսինթետազային ակտիվությունը զխտլեղում իջնում է 21%-ով, 60-րդ օրը՝ 49%-ով, 90-րդ օրը նրա ակտիվությունը վերականգնվում է և անգամ ձգտում է բարձրանալու:

2. Թունավորման նույն պայմաններում գլուտամինազայի ակտիվությունը զխտլեղում իջնում է 31%-ով թունավորման միայն 60-րդ օրը:

3. Գլուտամինսինթետազայի և գլուտամինազայի ակտիվության փոփոխությունը զխտլեղում ամենից շատ նկատվում է քլորոպրենային թունավորման 60-րդ օրը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агаджанов М. И. Биол. журн. Армении, т. 19, 9, 1966.
2. Ач Г., Балаж Р., Шрауб Ф. Укр. биох. журн., 25, 17, 1953.
3. Врба Р. Успехи современной биологии. 41, 3, 321, 1956.
4. Гершеневич З. С. и Кричевская А. А. Биохимия, т. 21, 715, 1956.
5. Кометиани П. А., Клейн Е. Э., Иорданишвили Г. С., Гвалия Н. В.
В сб. Вопросы биохимии нервной и мышечной систем. Тбилиси, стр. 45, 1965.
6. Мхитарян В. Г. Диссертация на соиск. ученой степени докт. биол. наук. Ереван, 1964.
7. Микаелян Э. М., Мхитарян В. Г. Сб. трудов Ереванского мед. института, в печати, 1967 г.
8. Палладин А. В., Полякова Н. М., Малышева М. К. ДАН СССР, 134, 5, 1236, 1960.
9. Силакова А. И., Труш Г. П., Яковлева А. Вопросы мед. химии, 8, 538, 1962.
10. Elliot N. H. Biochem. J. 49, 1, 1951.
11. Speck J. F. J. Biol. Chem. 179, 1387, 1949.
12. Meister A., Krishna-Swamy P. R. a col. Federat. Proc. v. 21, 16, 1013, 1962.
13. Meister A. a. Tise S. N. J. Biol. Chem. 187, 173, 1950.
14. Sayre F. W. a, Roberts E. J. Bio. Chem. 233, 1128, 1958.
15. Seligson D. a. Seligson H. J. Lab. Clin. Med. 38, 324, 1951.
16. Weil-Malherbe H. Biochem. J. 30, 665, 1936.
17. Wielland F., Pfeleiderer G. a. Saudmann B. Biochem. Z. 330, 198, 1958.