

Дж. А. АКОПЯН, Н. Г. ЭКИЗЯН, С. Г. МОВСЕСЯН

УЧАСТИЕ Д-НАД В ОКИСЛИТЕЛЬНОМ ДЕАМИНИРОВАНИИ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Проводились исследования по выявлению механизма образования свободного аммиака из глутаминовой кислоты (ГК) при участии никотинамид-гипоксантин-динуклеотида (Д-НАД) в интактных митохондриях печени кроликов. Были отмечены изменения активности глутамат-дегидрогеназы в зависимости от интенсивности переноса электронов в цепи окисления.

Полученные результаты показали, что выход свободного аммиака из ГК происходит путем ее окислительного деаминирования с участием ГК-дегидрогеназы и, что Д-НАД, являясь эффективным кофактором последней, сильно стимулирует эту реакцию. Аммиакообразование же из аспарагиновой кислоты осуществляется путем ее аминирования с Д-НАД и синтеза НАД [1].

Принимая во внимание особую роль дикарбоновых аминокислот, в частности глутаминовой и аспарагиновой (АК), в процессе аммиакообразования, а также их количественное превосходство над другими аминокислотами мы нашли целесообразным изучить вопрос прямого участия ГК-дегидрогеназы в образовании свободного аммиака из ГК при участии деамино-НАД. Целью наших исследований было выяснение механизма аммиакообразования из ГК при участии Д-НАД, а также изучение сравнительного действия Д-НАД на продуцирование аммиака из АК.

Материал и методика. Опыты ставились на кроликах. После декапитации быстро извлекали печень, измельчали до мелкой кашицы и гомогенизировали в 9-и объемах 0,25 молярного раствора сахарозы (рН 7,4). Все манипуляции проводились на холоду. Фракционирование гомогенатов проводили по методу Хогебума и Шнейдера [8]. На каждую пробу брали количество митохондрий, соответствующее 500 мг свежей ткани. Инкубировали в течение одного или двух часов в калий-фосфатном буфере (рН 7,4) при 37°. Аммиак определяли микродиффузионным методом Зелигсона в модификации Силаковой и сотр. [5, 10]. Добавки в мкМ: Д-НАД—1,43; ГК и АК—26,0; малонат—20,0; ротенон—3 мкг на пробу.

Результаты и обсуждение. Учитывая литературные данные относительно активации дегидрогеназного пути окисления ГК при торможении трансаминирования ее со ЩУК (щавелево-уксусной кислотой) [6, 9], а также основываясь на результатах, полученных в лаборатории нуклеотидов и аминокислот Института биохимии АН АрмССР [1—3], в первой серии опытов мы изучали влияние малоната на аммиакообразование из ГК в присутствии Д-НАД. Данные, полученные в первой серии опытов (табл. 1), свидетельствуют о том, что малонат и ГК, добавленные в отдельности, особых сдвигов в уровне аммиака не вызывают. Одновре-

менное добавление их вызывает незначительное повышение продукции аммиака по сравнению с пробами, содержащими только малонат.

Таблица 1

Выход аммиака из ГК под влиянием малоната в присутствии Д-НАД в митохондриальной фракции печени кролика, мкг на мг белка

Контроль инкубиро- ванный	ГК	Д-НАД+НА	Малонат	ГК+ малонат	ГК+НА +Д-НАД	ГК+малонат +Д-НАД+НА
6,0	5,51	7,2	5,1	6,6	16,7	23,2

(Средние данные 8-и опытов)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что малонат малоэффективен в образовании аммиака из добавленной ГК в условиях ингибции ее трансаминирования со ЩУК, т. е. весьма слабо активирует окислительное деаминирование ГК в присутствии Д-НАД. Д-НАД сильно активирует формирование свободного аммиака из ГК, что соответствует данным, ранее полученным в нашей лаборатории. Эти результаты позволили нам прийти к заключению, что образование аммиака из ГК с участием Д-НАД происходит путем активирования ГК-дегидрогеназы. Факт стимуляции образования свободного аммиака из добавленной ГК в присутствии Д-НАД заслуживает особого внимания, ибо эффект этот наблюдается в интактных митохондриях в условиях, близких к физиологическим.

Далее нами было установлено, что малонат резко интенсифицирует стимулируемую Д-НАД продукцию аммиака из ГК. Так, например, в опытах ГК+Д-НАД образуется 16,7 мкг аммиака на мг белка, между тем как в пробах, содержащих ГК+Д-НАД+малонат, уровень аммиака составляет 23,2 мкг/мг белка, т. е. на 6,5 мкг больше. Активирующее действие малоната на аммиакообразование из ГК, в частности в присутствии Д-НАД, может осуществляться двумя путями. Ингибируя окисление сукцината в ЩУК, малонат, с одной стороны, тормозит основной путь утилизации ГК, т. е. ее трансаминирование в АК, что должно привести к активированию окислительного деаминирования ГК, в частности в опытах с Д-НАД. С другой стороны, блокируя лимоннокислый цикл, малонат препятствует восстановлению ФАД в ФАДН₂, что благоприятствует окислению восстановленных пиридиннуклеотидов, образованных в ходе окислительного деаминирования ГК.

С целью подтверждения участия Д-НАД в аммиакообразовании путем активирования ГК-дегидрогеназы мы провели серию опытов на митохондриальной фракции сердечной мышцы, где активность ГК-дегидрогеназы весьма незначительна. Из приведенных данных (табл. 2) можно заключить, что Д-НАД, добавленный к пробам, содержащим ГК, довольно слабо стимулирует выход аммиака из него по сравнению с митохондриальной фракцией печени.

Полученные результаты подтверждают причастность ГК-дегидроге-

Таблица 2
Выход аммиака из ГК в присутствии Д-НАД в митохондриальной фракции
сердечной мышцы кролика, мкг на мг белка

Контроль инкубированный	ГК	АК	Д-НАД+НА	Д-НАД+НА +ГК	Д-НАД+НА +АК
6,2	7,42	8,1	6,59	8,86	10,88

(Средние данные 7-и опытов).

назы к аммиакообразованию с участием Д-НАД в качестве ее кофактора и согласуются с литературными данными относительно низкой активности ГК-дегидрогеназы в мышечной ткани сердца. Из приведенных результатов видно, что АК как сама по себе, так и в сочетании с Д-НАД продуцирует значительное количество свободного аммиака. Относительно интенсивный выход аммиака из АК в присутствии Д-НАД, по-видимому, осуществляется путем переаминирования АК с Д-НАД согласно схеме, предложенной ранее Бунятыном и Мовсесяном [1, 2].

Серия опытов, поставленная с целью изучения динамики выхода аммиака из ГК под действием Д-НАД в присутствии малоната в разные сроки инкубации, выявила прямую зависимость между сроками инкубации и уровнем продуцированного аммиака.

В пробах, содержащих Д-НАД+малонат, отмечается постепенное незначительное нарастание аммиака параллельно срокам инкубации. Продукция аммиака из ГК в присутствии малоната несколько более активируется и достигает своего максимума в пробах с 60-и минутной инкубацией, где уровень аммиака по сравнению с 10-и минутной инкубацией удваивается.

Таблица 3
Динамика выхода аммиака из ГК в присутствии Д-НАД под действием малоната
в митохондриальной фракции печеночной ткани кролика, мкг на мг белка

Время инкубации	10 мин	20 мин	40 мин	60 мин	90 мин
Контроль инкубированный	4,13	4,7	5,07	5,3	5,6
Д-НАД+НА+малонат	5,73	5,7	6,4	6,93	7,6
ГК+малонат	6,13	7,3	9,07	12,0	10,93
ГК+Д-НАД	6,4	7,7	10,8	16,7	18,0
ГК+Д-НАД+малонат	9,0	11,7	17,3	24,93	25,47

(Средние данные 5-и опытов).

Почти так же идет нарастание уровня аммиака в пробах с ГК+Д-НАД, однако в этом случае нарастание продолжается и после 60-и минутной инкубации, и к 90 мин количество аммиака почти утраивается, по сравнению с 10-и минутной инкубацией. Наибольший выход аммиака наблюдается в пробах ГК+Д-НАД+малонат, где уже к 10-ой мин инкубации выход аммиака удваивается; к 40 мин больше чем утраивается и к 60 мин увеличивается почти в 5 раз, по сравнению с контролем. По сравнению же с 10-и минутной инкубацией, к 90 мин уровень аммиака почти утраивается, доходя до 25,5 мкг на мг белка.

С целью получения определенного представления о механизме образования аммиака из ГК и АК с участием Д-НАД мы провели в дальнейшем серию экспериментов по изучению влияния малоната на аммиакообразование из указанных аминокислот.

Таблица 4

Выход аммиака из ГК, АК; ГК+АК под влиянием Д-НАД в присутствии малоната в митохондриальной фракции печени кролика, мкг на мг белка

Контроль инку- баций	ГК	АК	Д-НАД	ГК+ Д-НАД	АК+ Д-НАД	АК+ГК	ГК+ Д-НАД+ малонат	ГК+АК+ Д-НАД	АК+ Д-НАД+ малонат	ГК+АК+ Д-НАД+ малонат
6,2	8,6	9,8	9,4	18,4	16,4	12,1	31,0	26,6	10,7	44,0

(Средние данные 8-и опытов).

Как видно из приведенных в табл. 4 данных, в этой серии опытов также наблюдается значительный прирост аммиака из ГК в присутствии Д-НАД. Нарастание уровня аммиака наблюдается также в пробах, содержащих АК с Д-НАД. Под влиянием малоната в присутствии Д-НАД продуцирование аммиака из ГК, как и в предыдущих опытах, сильно активируется, тогда как из АК выход аммиака значительно подавляется. Интересно отметить, что, несмотря на это, в пробах, содержащих ГК и АК, одновременно под влиянием Д-НАД в присутствии малоната наблюдается большая активация продуцирования свободного аммиака, чем с ГК+Д-НАД+малонат. Эти данные позволяют заключить, что образование аммиака из ГК и АК происходит двумя различными путями.

Подавление продуцирования свободного аммиака из АК с Д-НАД под влиянием малоната, по-видимому, объясняется блокированием лимоннокислого цикла и, следовательно, нарушением синтеза АТФ, необходимого для реаминирования АК с Д-НАД. Активацию продукции аммиака при добавлении ГК к пробам, содержащим АК+Д-НАД+малонат, мы склонны объяснить тем, что добавленная ГК генерирует α -кетоглутарат, окисление которого способствует синтезу АТФ, необходимого для протекания реакции реаминирования АК с Д-НАД.

Исходя из сделанного нами предположения относительно механизма влияния малоната на аммиакообразование из АК+Д-НАД, а именно объясняя подавление аммиакообразования блокированием лимоннокислого цикла и нарушением синтеза АТФ, необходимого для реаминирования АК с Д-НАД, мы проследили за уровнем аммиака в этих пробах (АК+Д-НАД+малонат) при добавлении в среду АТФ.

Как видно из данных табл. 5, АТФ, добавленный к пробам, содержащим АК+Д-НАД+малонат, полностью снимает ингибицию, вызванную малонатом. Если под действием малоната продукция аммиака из АК+Д-НАД снижается примерно на 3 мкг/мг белка, то добавление АТФ на столько же повышает уровень аммиака.

Таблица 5

Выход аммиака из ГК и АК под влиянием Д-НАД в присутствии малоната и АТФ в митохондриальной фракции печени кролика, мкг на мг белка

Контроль инкубированный	ГК+Д-НАД	АК+Д-НАД	АК+Д-НАД +малонат	АК+Д-НАД +малонат +АТФ	ГК+Д-НАД +малонат	АТФ
6,1	18,8	14,4	11,7	17,7	33,3	9,25

(Средние данные 8-и опытов).

С целью выяснения механизма окислительного деаминирования ГК с участием Д-НАД в последующих опытах мы использовали ротенон как ингибитор первого пункта окислительного фосфорилирования. Ротенон, блокируя переход электронов от НАД-Н к ФАД, предотвращает реокисление восстановленного НАД, в результате чего ингибируется окислительное деаминирование ГК.

Таблица 6

Выход аммиака из ГК в присутствии Д-НАД под влиянием ротенона и при сочетании ротенона с малонатом в митохондриальной фракции печени кролика, мкг на мг белка

Контроль инкубированный	ГК+Д-НАД	ГК+Д-НАД +малонат	ГК+Д-НАД +ротенон	ГК+Д-НАД +малонат +ротенон
6,1	18,8	33,3	9,2	10,32

(Средние данные 7-и опытов).

Данные, приведенные в табл. 6, показывают, что в присутствии ротенона выход аммиака из ГК под влиянием Д-НАД сильно подавляется (почти в 4 раза). В присутствии малоната, как и в предыдущих опытах, продуцирование аммиака резко активизируется, доходя до 33,3 мкг/мг белка. В пробах, содержащих ГК+Д-НАД+малонат, ротенон почти полностью подавляет выход аммиака из ГК с участием Д-НАД.

Подытоживая полученные нами результаты, можно заключить, что выход аммиака из ГК происходит путем ее окислительного деаминирования с участием ГК-дегидрогеназы и, что Д-НАД является весьма эффективным кофактором в этой реакции. Деаминирование же АК происходит путем реаминирования ее с Д-НАД и образования промежуточного продукта НАД-сукцината, далее распадающегося на фумарат и НАД, деаминирование которого приводит к образованию свободного аммиака и Д-НАД.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 25.IX 1973 г.

Ջ. Հ. ՀԱԿՈՅԱՆ, Ն. Գ. ԷԿԻԶՅԱՆ, Ս Գ. ՄՈՎՍԵՍՅԱՆ

ԴՆԱԴ-ի ՄԱՍՆԱԿՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԳԼՈՒՏԱՄԻՆԱԹԹՎԻ ՕՔՍԻԴԱՑԻՈՆ ԴԵԱՄԻՆԱՑՄԱՆԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ներկա աշխատանքի նպատակն է եղել պարզաբանել գլուտամինաթթվից, ԴՆԱԴ-ի ներգործությամբ, ազատ ամոնիակի գոյացման մեխանիզմը ճաշարների լյարդի ինտակտ միտոքոնդրիաներում: Այդ կապակցությամբ համեմատական փորձեր են դրվել նաև ասպարագինաթթվի հետ: Ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ մալոնատը ցայտուն կերպով բարձրացնում է ԴՆԱԴ-ի խթանիչ ազդեցությունը գլուտամինաթթվից ամոնիակի առաջացման վրա: Ասպարագինաթթվի հետ կատարված փորձերում դիտվում է հակառակ պատկերը՝ մալոնատը ակնհայտ կերպով արգելակում է ամոնիակի առաջացումը ասպարագինաթթվից ԴՆԱԴ-ի ներկայությամբ:

ԱՏՖ-ը լրիվ չեզոքացնում է մալոնատի արգելակող ազդեցությունը ԴՆԱԴ-ով խթանվող ասպարագինաթթվից ամոնիակի արտազատման պրոցեսի վրա:

Ապացուցվել է, որ սրտամկանում, որտեղ գլուտամատ-դեհիդրոգենազ ֆերմենտի ակտիվությունը չափազանց ցածր է, ԴՆԱԴ-ը չի դրսևորում համապատասխան էֆեկտիվություն գլուտամինաթթվից ամոնիակի գոյացման պրոցեսում: Հակառակ դրան, սրտամկանի միտոքոնդրիաներում ԴՆԱԴ-ը նշանակալի չափերով խթանում է ամոնիակի գոյացումը ասպարագինաթթվից:

Շնչառական շղթայի առաջին փուլի ընտրողական արգելակիչ՝ ռոտենոնի հետ կատարված հետազոտություններից պարզվել է, որ վերջինս համարյա լրիվ չափով ճնշում է ԴՆԱԴ-ի խթանող ազդեցությունը ամոնիակի առաջացման վրա, ինչպես գլուտամինաթթվի հետ առանձին, այնպես էլ գլուտամինաթթու—ԴՆԱԴ փորձանմուշներում:

Ստացված աղյուսներին վերլուծությունը հանգեցնում է այն եզրակացության, որ լյարդի ամբողջական միտոքոնդրիաներում ԴՆԱԴ-ի խթանող ազդեցությունը գլուտամինաթթվից և ասպարագինաթթվից ազատ ամոնիակի առաջացման վրա իրականանում է տարբեր ճանապարհներով: Ամոնիակի գոյացումը գլուտամինաթթվից ԴՆԱԴ-ի ներգործությամբ տեղի է ունենում գլուտամինաթթվի օքսիդացիոն դեամինացման ճանապարհով: Ասպարագինաթթվից ամոնիակի արտազատումը տեղի է ունենում ԴՆԱԴ-ի հետ նրա դեամինացման, ՆԱԴ-ի համադրման և ապա վերջինիս դեամինացման ճանապարհով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бунятян Г. Х., Мовсесян С. Г. Вопросы биохимии мозга, Ереван, 2, 5, 1966.
2. Мовсесян С. Г. Докторская диссертация, Ереван, 1968.
3. Мовсесян С. Г., Акопян Дж. А. Вопросы биохимии мозга, Ереван, 4, 41, 1968.
4. Мовсесян С. Г., Бунятян Г. Х., Манасян Р. Ф. Вопросы биохимии мозга, Ереван, 4, 5, 1968.
5. Силакова А. И., Труш Г. П., Явилякова А. Вопросы медицинской химии, 8, 538, 1962.
6. Balazs R. Biochem J., 95, 497, 1965.
7. Hird F. J. R., Marginson M. A. Nature, 201, 1224, 1964.
8. Hogeboom G. H., Schneider W. C. J. Biol. Chem., 196, 111, 1952.
9. Katunuma N., Okada M. Proceedings of the Japan Academy, v. 38, 8, 572, 1962.
10. Seligson D. and Seligson H. J. Lab. and Clin. Med. 98, 324, 1951.