

УДК 577.1

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

НЕКОТОРЫЕ СТОРОНЫ РЕГУЛЯЦИИ ДЕАМИНО-НАД СТИМУЛИРУЕМОГО АММИАКООБРАЗОВАНИЯ ИЗ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ В МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ

Установлено, что деамино-НАД, в отличие от других пиридиннуклеотидов (НАД и НАДФ), сильно стимулирует окислительное деаминирование глутаминовой кислоты (ГК). Проведенные исследования показали, что эффект деамино-НАД на аммиакообразование из ГК осуществляется путем его интенсивного проникновения в митохондрии.

В предыдущих наших работах было показано, что деамино-НАД (Д-НАД) значительно усиливает продукцию аммиака из глутамата (ГК) в митохондриальной фракции различных тканей (печень, мозг, почки) [2, 3, 4]. Последующие эксперименты, проведенные на митохондриальной фракции печени [4], показали, что отщепление аммиака из ГК с участием Д-НАД происходит путем ее окислительного деаминирования.

В настоящей работе мы ставили цель более обстоятельно изучить коферментную функцию Д-НАД среди других пиридиннуклеотидов в активации ГК-дегидрогеназы в митохондриях печени.

Материал и методика. Исследования проводились в плане выявления функциональной зависимости стимулируемой Д-НАД ГК-дегидрогеназной реакции от переноса электронов в цепи окисления и изменения проницаемости митохондрий. Действие Д-НАД на продукцию аммиака изучали на фоне как прямого, так и косвенного торможения, а также стимулирования окисления пиридиннуклеотидов с помощью известных ингибиторов (малонат, ротенон) и некоторых соединений, шунтирующих перенос электронов в основных звеньях терминального окисления (менадион). С целью дифференцирования механизмов формирования аммиака из ГК и аспартата (АК) с участием Д-НАД в аналогичных условиях эксперимента параллельно изучали также процесс образования аммиака из АК.

Набухание митохондрий осуществляли тироксином и ионами Са, а нарушение их целостности — путем физического воздействия, а именно замораживания и оттаивания в изотонической и гипотонической средах.

Опыты ставили на кроликах. После декапитации быстро извлекали печень, измельчали до получения кашицы и гомогенизировали в 9-и объемах 0,25 молярного раствора сахарозы (рН 7,4) при 37°.

Аммиак определяли микродиффузионным методом Зелигсона в модификации Силаковой и сотр. [5, 14] (в мкг на мг белка). Среда инкубации: 0,133 М К-фосфатный буфер (рН 7,4)—0,1 мл; 0,2 М трис-НСl буфер (рН 7,4)—0,15 мл; $MgSO_4$ —0,12 М—0,1 мл; митохондриальная суспензия—0,5 мл.

Добавки в мкмолях: Д-НАД, НАД и НАДФ—1,43; ГК и АК—26,0; малонат—20,0; $CaCl_2$ — $1 \cdot 10^{-3}$ М; тироксин— $2 \cdot 10^{-5}$ М; ротенон—3 мкг и менадион—130,0 мкг на

пробу. Смесь доводили 0,25 М сахарозой до 1,5 мл. Инкубировали при 37° в течение 1 часа.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены результаты изучения сравнительного действия Д-НАД, НАД и НАДФ на образование аммиака из ГК в митохондриальной фракции печени. Полученные данные показывают, что из трех нуклеотидов лишь Д-НАД сильно стимулирует продуцирование аммиака из добавленной ГК. НАД и НАДФ сами по себе продуцируют заметные количества аммиака, но они вовсе не эффективны в окислительном деаминировании ГК. Прирост аммиака, наблюдаемый в опытах с добавлением НАД и НАДФ, объясняется деаминированием самих пиридиннуклеотидов с образованием их деаминоформ. Наблюдаемый факт является результатом неодинаковой проницаемости этих пиридиннуклеотидов и зависит от степени участия их в реакции окислительного деаминирования ГК.

Таблица 1

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

Контроль инкубиро- ванный	ГК	Д-НАД	НАД	НАДФ	ГК + Д-НАД	ГК + НАД	ГК + НАДФ
6,0	62	7,2	9,8	9,4	16,0	10,0	7,6

(Средние данные 7-и опытов).

Следующая серия опытов ставилась с целью проследить за выходом аммиака из ГК под действием Д-НАД при добавлении в среду менадиона как реагента, шунтирующего отдельные звенья дыхательной цепи [13, 15], и ротенона в качестве ингибитора первого этапа окисления [7, 9, 10].

Таблица 2

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

Контроль инкубированный	ГК	Ротенон	Менадион	ГК + менадион	ГК + Д-НАД	Менадион + Д-НАД	ГК + Д-НАД менадион	ГК + ротенон	ГК + Д-НАД + ротенон	Ротенон Д-НАД	Ротенон + менадион	Д-НАД + ГК + ротенон + менадион
5,4	5,8	5,0	4,8	8,4	12,5	4,9	11,9	5,3	6,1	4,8	4,0	10,4

(Средние данные 8-ми опытов).

Как видно из табл. 2, добавленный менадион ни сам по себе, ни в комбинации с Д-НАД не активирует аммиакообразование из эндогенной ГК. Интересно отметить, что менадион не активирует также стиму-

лируемое Д-НАД образование аммиака из добавленной ГК, тогда как в отсутствие Д-НАД эта активация очевидна. Прирост аммиака в пробах ГК + менадион составляет 3 мкг на мг белка.

Ротенон в этой серии опытов, как и в предыдущих наших исследованиях [1], довольно сильно ингибировал окисление как добавленной, так и эндогенной ГК в присутствии Д-НАД, что вполне объяснимо, так как, являясь ингибитором первого этапа окисления, он предотвращает реокисление восстановленного Д-НАД и, следовательно, ингибирует окислительное деаминирование ГК. Интересно отметить, что добавление менадиона к пробам, содержащим ротенон, почти не меняет уровня аммиака, тогда как в комбинации ГК + Д-НАД + ротенон он почти полностью снимает ингибирующее действие ротенона и, как видно из таблицы, повышает уровень аммиака до уровня его в пробах, содержащих ГК + Д-НАД + менадион.

В следующей серии опытов изучалась роль мембранной проницаемости митохондрий в аммиакообразовании. Нарушение мембранной проницаемости достигалось добавлением ионов Са и тироксина [8], а нарушение ее целостности — путем физического воздействия, замораживанием и оттаиванием. Тироксин вызывает изменения в мембране митохондрий с последующим набуханием их, возможно, в результате взаимодействия со связанной формой НАД [11, 12, 16].

Таблица 3
Выход аммиака из ГК в присутствии Д-НАД под влиянием тироксина и ионов Са в митохондриальной фракции печени кролика, мкг на мг белка

Контроль фиксированный	Контроль инкубированный	СаCl ₂	ГК	Д-НАД	Тироксин	ГК + Д-НАД	ГК + СаCl ₂	ГК + тироксин	Д-НАД СаCl ₂	Д-НАД ГК + СаCl ₂	Д-НАД ГК + тироксин
3,75	5,75	5,66	5,4	7,1	6,0	16,08	6,7	5,4	6,4	26,0	9,1

(Средние данные 7-и опытов).

Как видно из данных, приведенных в табл. 3, тироксин и ионы Са сами по себе заметных сдвигов в уровне аммиака не вызывают. Однако под действием Д-НАД продукция аммиака из ГК в присутствии ионов Са сильно активируется. Уровень его в пробах, содержащих ГК + Д-НАД + Са⁺⁺, доходит до 26 мкг на мг белка, это на 10 мкг больше, чем в пробах с ГК + Д-НАД. Тироксин же в intactных митохондриях не только не стимулирует аммиакообразование из ГК под действием Д-НАД, но и значительно ингибирует его (7 мкг на мг белка). Это подтверждает ГК-дегидрогеназное происхождение аммиака из ГК под влиянием Д-НАД.

Далее изучались изменения в выходе аммиака из ГК при нарушении целостности мембраны и разрушении мембраны под влиянием физических воздействий. В этой серии опытов параллельно с изучением влияния тироксина и ионов Са мы вели наблюдения над процессом аммиакообразования из ГК после трехкратного замораживания и оттаивания митохондрий с последующей часовой инкубацией. Как видно из данных табл. 4, в пробах, содержащих ГК+Д-НАД, после замораживания и оттаивания в изотоническом растворе сахарозы (0,25 М) уровень аммиака несколько возрастает.

Таблица 4

Выход аммиака из ГК в митохондриальной фракции печени кролика в присутствии Д-НАД, ионов Са, тироксина и при нарушении проницаемости и структурной целостности митохондрий, мкг на мг белка

Контроль фиксированный	Контроль инкубированный	Тироксин	СаCl ₂	ГК+Д-НАД	ГК+тироксин	ГК+Д-НАД+тироксин	ГК+Д-НАД+СаCl ₂	Контроль, замораживание, оттаивание	Замораживание, оттаивание Д-НАД+ГК
4,6	7,2	7,5	7,35	16,8	8,2	12,8	24,8	7,8	21,6

(Средние данные 6-и опытов).

Влияние замораживания и оттаивания на аммиакообразование из ГК под действием Д-НАД почти идентично действию ионов Са. Добавление тироксина подавляет этот процесс и в этих условиях.

Сравнение выхода аммиака из ГК+Д-НАД после замораживания и оттаивания в среде с сахарозой и в дистиллированной воде показало, что уровень аммиака при замораживании и оттаивании в дистиллированной воде во всех пробах выше, чем в пробах, замороженных в сахарозе, что объясняется более интенсивной деструкцией митохондрий в гипотонической среде.

Особенно большая разница между этими двумя сериями опытов (табл. 5 и 6) отмечалась в пробах, содержащих ГК+Д-НАД.

Если в среде с сахарозой добавление Д-НАД вдвое увеличивает продукцию свободного аммиака из ГК, то в дистиллированной воде — в 2,5 раза (по сравнению с одной ГК). Тироксин, добавленный к пробам, содержащим ГК+Д-НАД, в одном случае несколько понижает уровень аммиака, в другом — незначительно повышает его.

Заслуживает внимания тот факт, что при замораживании в среде с сахарозой ионы Са довольно сильно активируют стимулируемую Д-НАД продукцию аммиака из ГК, тогда как в дистиллированной воде выход аммиака, по-видимому, достигает максимума уже в пробах, содержащих ГК+Д-НАД, и добавление ионов Са не меняет уровня его.

Основываясь на этих данных, можно предположить, что при замораживании и оттаивании митохондрий в дистиллированной воде происхо-

Таблица 5
Выход аммиака из ГК в присутствии Д-НАД под действием тироксина и ионов Са после трехкратного замораживания и оттаивания митохондриальной фракции печени в сахарозе с последующей часовой инкубацией, мкг на мг белка

Контроль фиксиро- ванный	Контроль инкуби- рованный	ГК	ГК+ти- роксин	ГК+ Д-НАД	ГК+Д- НАД+ тироксин	ГК+ СаCl ₂	ГК+Д-НАД +СаCl ₂
5,0	8,6	11,5	11,5	20,4	18,2	9,6	34,0

(Средние данные 6-и опытов).

Таблица 9
Выход аммиака из ГК в присутствии Д-НАД под действием тироксина и ионов Са после трехкратного замораживания и оттаивания митохондриальной фракции печени в дистиллированной воде с последующей часовой инкубацией, мкг на мг белка

Контроль- фиксирован- ный	Контроль инкубиро- ванный	ГК	ГК+ ти- роксин	ГК+ +Д-НАД	ГК+ Д- НАД+ тироксин	ГК+ СаCl ₂	ГК+Д- НАД+ СаCl ₂
5,2	9,0	12,2	11,9	30,0	32,0	10,0	34,8

(Средние данные 5-и опытов)

дит почти полное разрушение митохондрий, чем и объясняется столь высокий уровень аммиака вообще и, в частности, в пробах, содержащих ГК+Д-НАД. Добавление ионов Са на этом фоне уже существенной роли не играет, тогда как при замораживании в среде с сахарозой происходит неполная деструкция митохондрий, и на этом фоне проявляется эффект ионов Са.

На основании полученных данных можно прийти к заключению, что продукция аммиака из ГК под действием Д-НАД происходит путем его окислительного деаминарования с участием ГК-дегидрогеназы. Из всех испробованных пиридиннуклеотидов самым эффективным кофактором в окислительном деаминаровании ГК в интактных митохондриях печени является Д-НАД.

Мы склонны думать, что стимулирующий эффект Д-НАД на ГК-дегидрогеназную реакцию осуществляется путем его интенсивного проникновения в интактные митохондрии, в отличие от других пиридиннуклеотидов, и энергичного контактирования с дыхательной цепью в качестве переносчика электронов.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 27.XII 1974 г.

2. Ա. ՀԱՆՈՐՅԱՆ, Ն. Գ. ԷՔԻԶՅԱՆ, Ա. Լ. ՊԱՊՈՎՅԱՆ, Ս. Գ. ՄՈՎՍԵՍՅԱՆ
ԳԼՈՒՏԱՄԻՆԱԹԻՎԻՑ ԴԵԱՄԻՆԱ-ՆԱԴ-ՈՎ ԽԹԱՆՎՈՂ ԱՄԻԱԿԱ-
ԳՈՅԱՑՄԱՆ ՈՐՈՇ ԿՈՂՄԵՐԻ ԿԱՆՈՆԱՎՈՐՈՒՄԸ ԼՅԱՐԴԻ
ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱԿ ՖՐԱԿՑԻԱՅՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ փորձարկված պիրիդին-նուկլեոտիդներից՝ դեամինա-նԱԴ, նԱԴ, նԱԴՖ գլուտամինաթթվից ազատամոնիակի արտազատման պրոցեսում ամենաարդյունավետոր դեամինա-նԱԴ-ն է: նԱԴ-ը և նԱԴՖ-ը համարյա բոլորովին չեն ակտիվացնում գլուտամինաթթվի օքսիդացիոն դեամինացումը:

Շնչառական շղթայի ընտրողական արգելակիչ՝ ռոտենոնը ամբողջությամբ արգելակում է դ-նԱԴ-ով խթանվող գլուտամինաթթվի օքսիդացումը: Մենադիոնը վերացնում է ռոտենոնի ազդեցությունը: Շա իոնները և թիրօքսինը, որոնք ազդում են միտոքոնդրիաների թաղանթային թափանցելիության վրա մասնակցում են գլուտամինաթթվից դ-նԱԴ-ի ներկայությամբ ամոնիակի արտազատման պրոցեսի կանոնավորմանը: Շա-ի իոնները ակտիվացնում են այդ պրոցեսը, մինչդեռ թիրօքսինը դրսևորում է հակառակ արդյունք: Միտոքոնդրիալ կառուցվածքների ամբողջականության խախտումը (սառեցում և հալեցում) նույնպես դ-նԱԴ-ի ազդեցությամբ մեծ չափերով խթանում է գլուտամինաթթվից ամոնիակի առաջացումը, ընդ որում այդ արդյունքը ավելի ցայտուն արտահայտվում է հիպոտոնիկ լուծույթներում: Հետևաբար, ամոնիակի արտազատումը գլուտամինաթթվից դ-նԱԴ-ի ներկայությամբ տեղի է ունենում վերջինիս օքսիդացիոն դեամինացման ճանապարհով՝ գլուտամատդե-հիդրոգենեզա ֆերմենտի մասնակցությամբ:

Ատացված տվյալները մատնանշում են, որ դեամինա-նԱԴ-ը հանդիսանում է գլուտամատ-դեհիդրոգենազա ֆերմենտի «իրական» կոֆակտորը:

ЛИТЕРАТУРА

1. Акопян Дж. А., Экизян Н. Г., Мовсисян С. Г. Биологический журнал Армении, 27, 4, 1974.
2. Мовсисян С. Г., Акопян Дж. А. Вопросы биохимии мозга, Ереван, 1968.
3. Мовсисян С. Г. Докт. дисс., Ереван, 1968.
4. Мовсисян С. Г. Вопросы биохимии мозга, Ереван, 1972.
5. Сулакова А. И., Труш Г. П., Явилякова А. Вопросы мед. химии, Ереван, 8, 538, 1962.
6. Хесин Р. Б. Биохимия цитоплазмы, М., 63, 1962.
7. Burgos J. and Redfearn. Biochem Biophys acta, 110, 475, 1965.
8. Gutman M., Singer Th. P., Casida J. E. Biochem. and Biophys. Res Commun, 4, 37, 1969.
9. Hatefi J. Prac. Nat. Acad. Sci USA, 2, 60, 1968.
10. Horgan D. J., Signer Th. P., Casida J. E. J. Biol. chem., 4, 243, 1968.
11. Lehninger A. L. in Enzymes units of Biological Structure and Function Ed. Gaebler O. H. New York, Academic Press, 1956.
12. Lehninger A. L., Ray B. L., Snieder M. J. Biophys. Biochem Cytol., 1959.
13. Mlstra Hara P., Fridovitch J. J. Biol. chem., 1, 247, 1972.
14. Selligson D. and Selligson H. J. Lab and Clin. Med., 98, 324, 1951.
15. Sulr A. R., Goss H. Biochem. and Biophys acta, 21, 578, 1956.
16. Tapley D. F., Cooper C., Lehninger A. L. Biochem. Biophys. acta, 18, 579, 1955.