

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЛУТАМИНАЗЫ
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС

В. С. ОГАНЕСЯН, В. Г. АМБАРЦУМЯН

Изучение глутаминазы печени показало, что при pH 8,5 одновременное применение фосфата и активаторов фосфатнезависимой глутаминазы приводит к полному подавлению эффекта одного из них, а при pH 7,5, наоборот, происходит потенцирование их стимулирующего действия. Тироксин, являясь сильным активатором глутаминазы мозга, не действует на активность глутаминазы печени.

Деамидирование глутамина в печени, почках и мозге животных осуществляется под действием фосфатзависимого (ФЗГ) и фосфатнезависимого (ФНГ) изоэнзимов глутаминазы, которые активируются различными низкомолекулярными соединениями неорганической и органической природы [1—5].

В результате многолетних исследований выявлен ряд новых активаторов глутаминазы, ~~обладающих сильным стимулирующим эффектом [6—13]. Среди известных активаторов мозга наиболее эффективным является тироксин [6—8].~~

~~Проведенные нами исследования показали, что в митохондриальной фракции мозга кролика и крыс процесс регуляции активности глутаминазы носит сложный и поливалентный характер. Особое место в этом процессе занимает тироксин. При одновременном применении тироксина с фосфатом или эффекторами ФНГ происходит сильное потенцирование их стимулирующего действия [7]. То же наблюдается при сочетании фосфата с активаторами ФНГ, но значительно слабее [15—16]. Следует отметить, что этого не происходит в опытах с почечной глутаминазой [13, 14]. Печеночная глутаминаза в этом аспекте практически не изучена.~~

Исходя из вышесказанного, мы задались целью выяснить, активирует ли тироксин глутаминазу митохондриальной фракции печени, и изучить взаимоотношение эффекта различных активаторов этого фермента.

Материал и методика. В качестве источника глутаминазы использовали митохондриальную фракцию, полученную из печеночной ткани крыс. Печень сразу после удаления пленки и промывания холодным раствором сахарозы гомогенизировали в 9 объемах 0,25 М раствора сахарозы в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в течение 6 мин. После осаждения ядерной фракции (700 g в течение 6 мин) центрифуги-

рованием надосадочной жидкости при 16000 г в течение 25 мин выделяли митохондриальную фракцию. Полученную фракцию промывали холодной дистиллированной водой и центрифугировали при 80000 г в течение 15 мин. Затем из осадка готовили взвесь из расчета 200 мг ткани в 0,4 мл воды, которую после выдерживания при комнатной температуре в течение 1 часа использовали в качестве источника глутаминазы. Для опытов с pH 8,5 брали 0,4 мл взвеси, соответствующей 50 мг ткани, а для опытов с pH 7,5—соответствующей 200 мг ткани на пробу.

Инкубационная смесь содержала: 0,4 мл митохондриальной фракции, 0,5 мл 0,2М трис-HCl буфера pH 7,5 или 8,5, L-глутамина—20 мкмоль/мл, активаторы в различных концентрациях. Общий объем доводили водой до 1,5 мл. Смесь инкубировали 20 мин при 37° при постоянном встряхивании, после чего к каждой пробе добавляли по 0,3 мл 15%-ной трихлоруксусной кислоты и центрифугировали. О глутаминазной активности судили по количеству образовавшегося аммиака, который определяли микродиффузионным методом Зеллгосона в модификации Силаковой и сотр. [17].

Результаты и обсуждение. Известно, что ФЗГ в животных тканях активируется фосфатом, ацетил-КоА и ацил-производными жирных кислот—КоА, а ФНГ—малеатом, малонатом, продуктами цикла трикарбоновых кислот и ацетил-аминокислотами [4, 5, 9, 11].

Исходя из поставленной задачи, в первой серии опытов мы изучали действие тироксина, фосфата, активаторов ФНГ и различных их сочетаний на активность глутаминазы митохондриальной фракции печени.

Таблица 1

Влияние различных эффекторов на активность глутаминазы митохондриальной фракции печени в присутствии фосфата и цитрата, NH_3 мкмоль/г свежей ткани, pH 8,5

Активаторы	Концентрация, мкмоль/мл	Контроль	NaH_2PO_4 , мкмоль/мл		Цитрат, мкмоль/мл
			2,5	5	10
			25±1,5 (16)	66±1,9 (16)	49±1,2 (16)
Цитрат	5	11±1,2 (18)*	29±2,8 (16)	56±2,5 (16)	—
Цитрат	10	49±1,2 (17)	56±3,3 (13)	69±3,0 (15)	—
Цитрат	20	56±2,5 (19)	—	77±5,1 (9)	—
L-аспартат	20	35±5,2 (20)	49±2,9 (9)	90±6,3 (9)	74±4,7 (9)
N-ацетил-L-аспартат	20	39±3,1 (15)	53±2,5 (8)	70±4,6 (8)	76±4,1 (9)
Сукцинат	20	34±4,2 (15)	45±2,6 (8)	78±5,8 (9)	70±3,2 (9)
L-тироксин	0,1	2,2±0,9 (9)	—	76±4,9 (6)	51±7,3 (6)
	0,2	3,8±1,2 (12)	—	87±8,8 (12)	55±7,1 (12)

* в скобках здесь и в остальных таблицах указано количество опытов.

Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что при pH 8,5 под действием испытанных нами эффекторов глутаминаза стимулируется в различной степени, наиболее эффективно—в присутствии фосфата. Ак-

тивирующее действие цитрата слабее, чем фосфата, но значительно сильнее, чем остальных эффекторов, а L-аспартат (АК), N-ацетил—L-аспартат (ААК) и сукцинат, добавленные по 20 мкмоль/мл, примерно в одинаковой степени усиливали деамидирование глутаминна.

Из полученных результатов заслуживает внимания тот факт, что тироксин даже при сравнительно высоких концентрациях практически не стимулирует активность глутаминназы (табл. 1).

Следует отметить, что стимулирующее действие вышеуказанных соединений на активность глутаминназы митохондриальной фракции мозга выражено сильнее, чем в печени, а тироксин, как уже отмечалось, не только является самым сильным активатором этого фермента, но и значительно усиливает стимулирующее действие других эффекторов. Примечательно, что сочетание совершенно неэффективных концентраций тироксина с фосфатом или другими активаторами тоже приводит к усилению их стимулирующего действия на активность глутаминназы мозга [7]. Однако исследования, проведенные с глутаминназой митохондриальной фракции печени, показывают, что сочетание тироксина с другими активаторами не приводит к сколько-нибудь заметному усилению их стимулирующего действия. Наряду с этим выяснилось, что одновременное применение фосфата с цитратом или же сочетание этих соединений с другими активаторами также не приводит к усилению их стимулирующего действия. Более того, при этом происходит подавление эффекта одного из активаторов. Это означает, что при рН 8,5 в действии различных активаторов глутаминназы печени не обнаруживается положительной кооперативности. В аналогичных исследованиях, проведенных с глутаминназой митохондриальной фракции мозга, наблюдается обратная картина [16].

Учитывая то обстоятельство, что в митохондриальной фракции мозга кролика при низких значениях рН эффект потенцирования при одновременном применении двух активаторов еще больше усиливается [16], мы решили проводить наши исследования при рН 7,5.

Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что при рН 7,5 АК, ААК и сукцинат, добавленные в отдельности, даже в концентрации 60 мкмоль/мл не влияют на активность глутаминназы митохондриальной фракции печени, однако одновременное применение этих соединений с фосфатом резко усиливает их стимулирующее действие, причем разные концентрации фосфата в различной степени. Наибольший эффект потенцирования наблюдается при сочетании активаторов с 5 мкмоль/мл фосфата, с повышением концентрации фосфата этот эффект уменьшается и полностью исчезает при 20 мкмоль/мл.

Далее, мы исследовали влияние различных эффекторов на активность глутаминназы печени в присутствии цитрата. Данные табл. 3 показывают, что при одновременном применении АК, ААК или сукцината с цитратом также наблюдается потенцирование их стимулирующего действия, причем в этом случае оно происходит сильнее, чем в случае

Таблица 2

Влияние различных эффекторов на активность глутаминазы митохондриальной фракции печени, NH_3 мкмоль/г свежей ткани, pH 7,5.

Активаторы	Концентрация, мкмоль/мл	Контроль	NaH_2PO_4 , мкмоль/мл		
			5	10	20
Цитрат	10	$1,1 \pm 0,5$ (30)	$2,3 \pm 0,5$ (26) $35 \pm 5,2$ (12)	$25 \pm 3,0$ (20) $42 \pm 4,7$ (12)	$65 \pm 5,4$ (18) $65 \pm 5,7$ (12)
Цитрат	20	$39 \pm 2,3$ (30)	$32 \pm 2,2$ (10)	$37 \pm 2,2$ (10)	—
L-аспартат	20	$0,6 \pm 0,2$ (18)	$9 \pm 1,7$ (10)	$31 \pm 5,0$ (10)	$71 \pm 6,6$ (12)
L-аспартат	40	$1,7 \pm 0,3$ (18)	$13 \pm 2,1$ (9)	$32 \pm 3,7$ (9)	—
L-аспартат	60	$1,4 \pm 0,5$ (10)	$17 \pm 1,7$ (10)	—	—
N-ацетил-L-аспартат	20	$0,3 \pm 0,05$ (18)	$19 \pm 2,7$ (8)	$34 \pm 2,5$ (8)	$68 \pm 8,2$ (8)
N-ацетил-L-аспартат	40	$0,9 \pm 0,1$ (12)	$38 \pm 4,3$ (6)	$38 \pm 4,3$ (6)	—
N-ацетил-L-аспартат	60	$1,1 \pm 0,1$ (10)	$40 \pm 5,0$ (10)	—	—
Сукцинат	20	$3,0 \pm 0,6$ (18)	$16 \pm 2,0$ (12)	$40 \pm 4,0$ (12)	$68 \pm 7,5$ (12)
Сукцинат	40	$2,3 \pm 0,3$ (18)	$35 \pm 4,5$ (10)	$35 \pm 4,7$ (10)	—
Сукцинат	60	$7,0 \pm 2,1$ (10)	$40 \pm 5,3$ (10)	—	—
L-тироксин	0,05	$1,7 \pm 0,3$ (10)	$5,5 \pm 1,5$ (8)	$28 \pm 3,7$ (8)	—
L-тироксин	0,1	$1,1 \pm 0,2$ (18)	$8,0 \pm 1,7$ (9)	$31 \pm 4,4$ (9)	—
L-тироксин	0,2	$1,4 \pm 0,2$ (10)	$8,5 \pm 2,2$ (10)	—	—

сочетания их с фосфатом. С повышением концентрации цитрата эффект потенцирования значительно слабеет.

Как выяснилось из наших исследований, тироксин при pH 8,5 и при pH 7,5 практически не повышает активность глутаминазы, а в сочетании с фосфатом или цитратом наблюдается незначительное усиление их стимулирующего действия. Итак, можно заключить, что глутаминаза митохондриальной фракции печени крыс инертна к действию тироксина.

Графическое изображение полученных данных показывает, что при pH 7,5 зависимость активности фермента от концентрации фосфата и цитрата имеет типичную сигмоидную форму, что не наблюдалось при pH 8,5 (рис. 1). При совместном применении фосфата или цитрата с другими эффекторами ФНГ кривая зависимости активности фермента от концентрации фосфата и цитрата из сигмоидной формы приближается к гиперболе (рис. 1 и 2). Эти данные свидетельствуют об аллостерической природе обоих изоэнзимов глутаминазы митохондриальной фракции печени. Вероятно, при pH 7,5 благодаря гомотропной поло-

Влияние различных эффекторов на активность глутаминазы печени в присутствии цитрата, NH_3 мкмоль/г свежей ткани, pH 7,5

Активаторы	Концентрация, мкмоль/мл	Контроль	Цитрат, мкмоль/мл	
			10	20
L-аспартат	20	$0,6 \pm 0,2$ (16)	$1,1 \pm 0,5$ (30) $26 \pm 3,0$ (12)	$39 \pm 2,3$ (30) $45 \pm 4,1$ (10)
L-аспартат	40	$1,7 \pm 0,3$ (18)	$32 \pm 2,5$ (9)	$48 \pm 2,4$ (9)
N-ацетил-L-аспартат	20	$0,3 \pm 0,05$ (18)	$34 \pm 5,0$ (12)	$46 \pm 2,2$ (12)
N-ацетил-L-аспартат	40	$0,9 \pm 0,1$ (18)	$41 \pm 5,2$ (9)	$57 \pm 3,6$ (9)
Сукцинат	20	$3,0 \pm 0,6$ (18)	$51 \pm 3,8$ (9)	$60 \pm 4,6$ (9)
Сукцинат	40	$2,3 \pm 0,3$ (12)	$48 \pm 4,1$ (8)	$54 \pm 5,0$ (8)
L-тироксин	0,1	$1,1 \pm 0,2$ (18)	$4,4 \pm 0,6$ (9)	$38 \pm 4,2$ (9)
L-тироксин	0,2	$1,4 \pm 0,1$ (18)	$8,8 \pm 2,2$ (10)	$41 \pm 5,7$ (10)

жительной кооперативности, возникающей вследствие взаимодействия регуляторных центров глутаминазы митохондриальной фракции печени под влиянием фосфата или цитрата, происходит выраженный конформационный переход молекулы фермента. Между тем как конформационный переход, возникающий при низкой концентрации одного эффектора, по-видимому, недостаточно выражен и не затрагивает каталитического центра фермента, но одновременное добавление двух активаторов быстро приводит к образованию каталитически активной формы фермента. Возможно, этим и объясняется обнаруженный в указанных условиях эффект потенцирования. С повышением pH среды чувствительность ФЗГ и ФНГ к эффекторам повышается, и уже при pH 8,5 деамидирование глутамин, осуществляемое обоими изоэнзимами глутаминазы, протекает достаточно интенсивно. По-видимому, вследствие этого при высоких значениях pH физиологическая необходимость эффекта потенцирования, возникающего благодаря положительной кооперативности, исчезает.

Как показывают полученные данные, процесс регуляции активности глутаминазы митохондриальной фракции печени, так же как и мозга, носит поливалентный характер. Из наших исследований выяснилось также, что регуляторные свойства глутаминазы мозга и печени принципиально отличаются друг от друга. Так, в регуляции активности глутаминазы мозга тироксин занимает центральное место, в то время как глутаминаза печени совершенно инертна к действию этого гормона. Следует отметить, что тироксин специфически действует на активность глутаминазы мозга. Его действие по целому ряду параметров прин-

ципиально отличается от действия остальных активаторов. В связи с этим возникает вопрос—может ли тироксин действовать на активность глутаминазы других органов? Как показывают проводимые нами в нас-

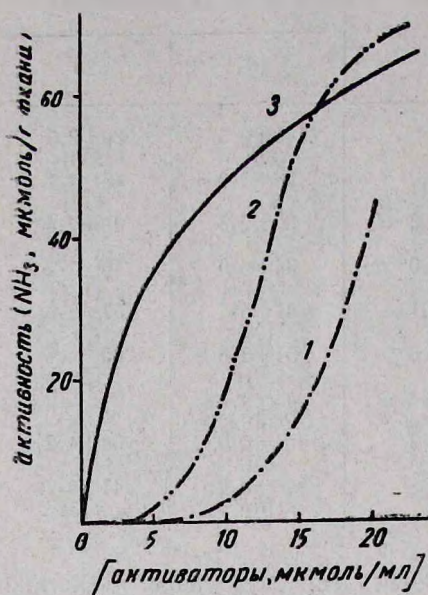


Рис. 1.

Рис. 1. Влияние фосфата и цитрата на активность глутаминазы в отдельности и при их совместном применении (рН 7,5) 1—цитрат; 2—фосфат; 3—фосфат+цитрат—10 мкмоль/мл.

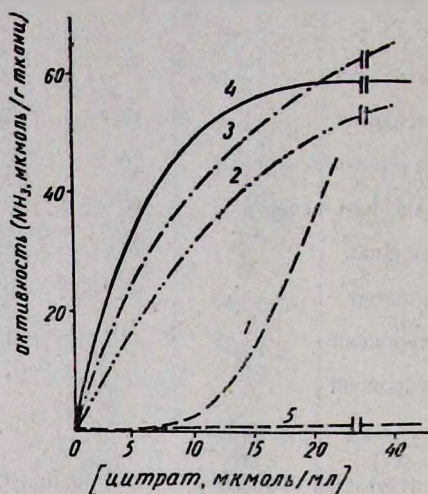


Рис. 2.

Рис. 2. Влияние различных эффекторов на активность глутаминазы в отдельности и в присутствии цитрата (рН 7,5) 1—цитрат; 2—цитрат+АК—40 мкмоль/мл; 3—цитрат+ААК—40 мкмоль/мл; 4—цитрат+сукцинат—40 мкмоль/мл; 5—ААК и сукцинат—по 40 мкмоль/мл.

тоящее время исследования, тироксин оказывает стимулирующее действие на активность глутаминазы почек, а в сочетании с фосфатом их стимулирующее действие сильно потенцируется. Об этих исследованиях будет сообщено отдельно.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 26.XII 1977 г.

ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ՄԻՏՈՔՈՆԻՐԻԱԿ ՖՐԱԿՑԻԱՅԻ ԳԼՅՈՒՏԱՄԻՆԱԶԱՅԻ
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Վ. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Վ. Գ. ՀԱՄԲԱՐՁՈՒՄՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է լյարդի գլյուտամինազայի ակտիվության կարգավորումը թիրոքսինի, ֆոսֆատի և գլյուտամինազայի ֆոսֆատոշկախյալ իզոֆերմենտի այլ ակտիվատորների առկայության, ինչպես նաև նրանց տարբեր դոզորդման դեպքում: Պարզվել է, որ թիրոքսինը (ուղիղի գլյուտամինազայի

ամենահղոր ափսիվատորը) բուրրովին չի ազդում լյարդի գլյուտամինազայի ափսիվության վրա, ինչպես նաև չի ուժեղացնում այլ ափսիվատորների խթանող ազդեցությունը:

7,5 pH-ի դեպքում ֆոսֆատի և ցիտրատի զուգորդումը, ինչպես նաև այս միացությունների և ֆոսֆատոշկալայալ իզոֆերմենտի այլ էֆեկտորների համատեղ օգտագործումը հանգեցնում է նրանց ֆերմենտի ափսիվության վրա ցուցաբերած խթանող ազդեցության զգալի ուժեղացման: Սակայն միջավայրի pH-ի բարձրացման հետ մեկտեղ պոտենցման էֆեկտը լրիվ անհետանում է: Հաստատված է, որ ֆերմենտի ափսիվության կախվածությունը ֆոսֆատի և ցիտրատի քանակից 7,5 pH-ի դեպքում կրում է լավ արտահայտված S-ձև-բնույթ, իսկ երկու ափսիվատորների համատեղ օգտագործման, ինչպես նաև 8,5 pH-ի դեպքում այն փոխվում է հիպերբոլի: Ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ լյարդի և ուղեղի գլյուտամինազայի կարգավորիչ հատկությունները սկզբունքորեն զանազանվում են մեկը մյուսից:

REGULATION OF GLUTAMINASE ACTIVITY IN MITOCHONDRIAL FRACTION OF RAT LIVER

V. S. HOVHANNISSIAN, V. G. HAMBARTSUMIAN

The results obtained show that the regulation of glutaminase activity of mitochondrial fraction of rat liver is very different from that of the brain glutaminase.

Thyroxin (the activator of the brain glutaminase) has no effect on the liver glutaminase activity. Kinetic data indicate that the liver glutaminase displays a typical sigmoidal velocity curve with respect to the phosphate concentration, while the addition of other activators changes the sigmoidal curve to a normal one.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Errera M., Greenstein I. J. Biol. Chem., 178, 495, 1949.
2. Greenstein I. P., Carter C. E. J. Nat. Cancer Inst., 7, 57, 1946.
3. Katunuma N., Tomino J., Nishio H. Biochem. and Biophys. Res. Comm., 22, 321, 1966.
4. Katunuma N., Huzino A., Tomino J. Adv. Enzym. Reg., 5, 55, 1967.
5. Katsunuma T., Temma M., Katunuma N. Biochem. and Biophys. Res. Comm., 32, 433, 1968.
6. Оганесян В. С. ДАН АрмССР, 48, 171, 1969.
7. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. Л. Вопросы биохимии мозга, 6, 5, Ереван, 1970.
8. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж. Вопросы биохимии мозга, 8, 77, Ереван, 1973.
9. Kvamme E., Torgner I. A. Biochem. J., 137, 3, 525, 1974.
10. Kvamme E., Torgner I. A. FEBS Letters, 47, 2, 1974.
11. Kvamme E., Torgner I. A. Biochem. J., 149, 83, 1975.
12. Well-Malherbe H., Beall G. D. J. Neurochem., 17, 1101, 1970.
13. Well-Malherbe H. J. Neurochem., 19, 2257, 1972.
14. Svenneby C., Tveit B., Kvamme E. J. Biol. Chem., 245, 8, 1878, 1970.
15. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х. Вопросы биохимии мозга 4, 81, Ереван, 1968.
16. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С. Вопросы биохимии мозга, 5, 5, Ереван, 1969.
17. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вопросы мед. химии, 8, 538, 1962.