

ВЛИЯНИЕ ТИРЕОИДНЫХ И СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАМИНАЗЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС

В. С. ОГАНЕСЯН, В. Г. АМБАРЦУМЯН

Установлено, что 3,3',5-трийод-L-тиронин (T_3), 3,5-дйод-L-тиронин (T_2) и 3,3',5-трийодтиреосульфатная кислота (ТАА) сильно подавляет эффект различных активаторов глутаминазы печени. Тепловая обработка митохондриальной фракции, проведенной в присутствии фосфата, приводит к значительной потере чувствительности фермента к тормозящему действию этих соединений.

Стероидные гормоны оказывают слабое ингибирующее влияние на стимулирующий эффект всех испытанных активаторов печеночной глутаминазы.

Глутаминаза животных тканей, обладая слабой каталитической активностью, стимулируется различными низкомолекулярными соединениями органической и неорганической природы [7, 9, 11, 13, 14]. Процесс регуляции этого фермента в разных органах имеет свои отличительные особенности. Для глутаминазы митохондриальной фракции мозга крыс наиболее эффективными активаторами являются гормоны щитовидной железы—тироксин (T_4), T_3 и их аналоги, которые не только оказывают сильное стимулирующее действие на активность фермента, но и значительно усиливают активирующее влияние других эффекторов [5—7]. Между тем на активность глутаминазы печени тиреоидные гормоны действуют по-разному. T_4 , как в отсутствие, так и в присутствии активаторов не влияет на активность фермента, а T_3 и его аналоги сильно подавляют стимулирующий эффект фосфата. Активирующее же влияние цитрата угнетается заметно слабее [4]. Ввиду этого в настоящей работе мы изучили влияние T_3 и различных его производных на активность глутаминазы печени в присутствии других ее эффекторов. Кроме того, было также изучено действие некоторых стероидных гормонов и диэтилстильбестрола (ДЭС) на активность печеночного фермента.

Материал и методика. Получение митохондриальной фракции печени и определение активности глутаминазы проводили по ранее описанной методике [3]. Инкубационная смесь (1,5 мл) содержала: 0,5 мл взвеси митохондриальной фракции, соответствующей 50 мг ткани, 0,5 мл, 0,2 М трис-НСl буфера, рН 8,5, 20 мкмоль/мл L-глутамин, различные концентрации активаторов и ингибиторов. Растворы стероидных гормонов и ДЭС готовили на воде, поскольку даже незначительные количества растворителя-пропандиола приводили к полной инактивации фермента. Нами использовались гормональные препараты производства фирмы Sigma (США).

Результаты и обсуждение. Как видно из данных, представленных в табл. 1, T₃, T₂ и ТАА сильно ингибируют активность глутаминазы печени, стимулируемой аспаратом, сукцинатом и малеатом. Их действие в зависимости от применяемого активатора проявляется в различной степени. Так, в присутствии 0,025 мкмоль/мл T₂ и ТАА стимулирующий эффект малеата подавляется слабо, в то время как действие сукцината угнетается очень сильно, а аспартата исчезает полностью. Наиболее эффективным из испытанных ингибиторов является T₂, а наименее—T₃.

Таблица 1

Влияние T₃ и его производных на активность глутаминазы митохондриальной фракции печени (NH₃, мкмоль/г свежей ткани) в присутствии АК, сукцината и малеата (рН 8,5).

Добавки, мкмоль/мл		Аспарагиновая кислота	Сукцинат	Малеат
		20	20	20
Контроль		32±1,6 (9)*	47±3,0 (10)	63±3,8 (9)
3,5-дигидро-L-тиронин	0,0125	10±1,0 (7)	30±3,0 (7)	52±1,2 (6)
	0,025	0 (6)	13±2,1 (7)	25±2,5 (6)
3,3',5'-тригидро-L-тиронин	0,0125	23±1,5 (7)	38±2,2 (7)	59±3,5 (6)
	0,025	18±1,7 (6)	29±2,1 (7)	49±1,3 (6)
3,3',5'-тригидропиреоуксусная кислота	0,0125	13±2,1 (7)	26±1,8 (7)	60±5,0 (6)
	0,025	0 (6)	5±0,2 (7)	34±3,0 (6)

* Здесь и далее в скобках количество опытов.

Полученные нами данные показывают, что при рН 8,5 малеат достаточно эффективно активирует глутаминазу печени. Между тем как Хаанг и Нокс на основании проведенных ими исследований пришли к заключению, что печеночная глутаминаза вообще не стимулируется малеатом [8]. В своих экспериментах эти авторы изучали влияние малеата на активность глутаминазы только при рН 7,5 [8]. Как выяснилось из наших исследований, при этом значении рН малеат, а также сукцинат и АК, даже при достаточно высоких концентрациях, не влияют на активность печеночной глутаминазы.

Ранее проведенные нами исследования с глутаминазой митохондриальной фракции мозга показали, что в присутствии глутаминовой кислоты (ингибитора глутаминазы) эффект потенцирования, возникающий при сочетанном применении двух активаторов, многократно возрастает, вследствие чего тормозящее действие глутамата исчезает [1]. В связи с этим представляло интерес изучить влияние T₂ на активность глута-

миазы печени при одновременном добавлении фосфата и цитрата. Как видно из рис. 1, в этих условиях ингибирующее действие T_2 не только не устраняется, а напротив, значительно усиливается. Так, если под действием 0,025 мкмоль/мл T_2 стимулирующее влияние цитрата, добавленного в отдельности, подавляется на 48%, то при сочетанном применении фосфата и цитрата его тормозящее действие почти вдвое усиливается.

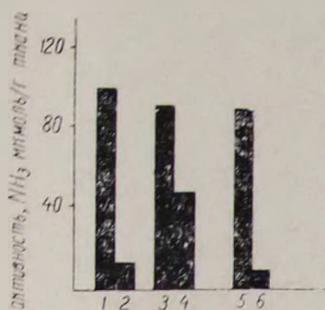


Рис. 1.

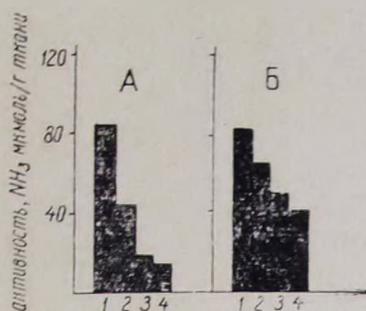


Рис. 2.

Рис. 1. Влияние T_2 на активность глутаминазы митохондриальной фракции печени при совместном применении фосфата и цитрата рН 8,5. 1—фосфат—20 мкмоль/мл; 2—фосфат+ T_2 —0,025 мкмоль/мл; 3—цитрат—2 мкмоль/мл; 4—цитрат+ T_2 ; 5—фосфат+цитрат; 6—фосфат+цитрат+ T_2 .

Рис. 2. Влияние тепловой обработки (45°, 10 мин) на активность глутаминазы печени. 1—фосфат—20 мкмоль/мл; 2—фосфат+ T_2 —0,025 мкмоль/мл; 3—фосфат+ T_3 —0,025 мкмоль/мл; 4—фосфат+ТАА—0,025 мкмоль/мл; А—взвесь митохондриальной фракции печени без нагрева. Б—та же взвесь, нагретая в присутствии 20 мкмоль/мл фосфата. Ингибиторы добавлены после нагрева.

Далее для выяснения характера действия T_3 и его аналогов на активность глутаминазы печени взвесь митохондриальной фракции подвергали тепловому воздействию. Известно, что глутаминаза печени термолабильна и полностью инактивируется при нагревании до 50° [8, 9]. Как выяснилось из наших опытов, термообработка митохондриальной фракции печени, проведенная при 45° в течение 10 мин приводит к резкому падению глутаминазной активности. В целях предохранения фермента от инактивации тепловую обработку проводили в присутствии фосфата, цитрата или малеата. Оказалось, что из испытанных активаторов только фосфат предохраняет глутаминазу от инактивации, при этом чувствительность фермента к действию T_3 и его производных меняется. Как видно из рис. 2, в ненагретой митохондриальной фракции активность глутаминазы, стимулируемой фосфатом, под действием T_2 и ТАА сильно подавляется, а в опытах с термообработкой, проведенной в присутствии фосфата, ингибирующее действие этих соединений значительно слабеет. Следовательно, тепловая обработка приводит к заметной десенсбилизации фермента.

Влияние некоторых стероидных гормонов и диэтилстильбестрола на активность
 глутаминазы митохондриальной фракции печени
 (NH_3 , мкмоль/г свежей ткани) pH 8,5.

Добавки, мкмоль/мл	Фосфат	Цитрат	Сукцинат	N-ацетил-L-аспаргат	Аспаргат	
	10	20	20	20	20	
Контроль	115±4,0 (15)	90±8,5 (2)	50±2,4 (8)	56±2,2 (9)	38±3,2 (9)	
Диэтилстильбестрол	0,1	—	52±1,6 (6)	47±2,8 (6)	30±3,0 (6)	
	0,2	98±9,1 (8)	81±6,0 (6)	44±3,4 (6)	46±1,7 (9)	32±2,9 (7)
Тестостерон	0,1	—	48±1,4 (6)	51±2,9 (6)	33±2,0 (6)	
	0,2	92±8,8 (9)	82±8,1 (6)	53±4,9 (6)	46±1,4 (9)	28±1,4 (6)
Кортикостерон — ацетат	0,1	—	57±3,6 (6)	51±2,5 (6)	27±2,0 (6)	
	0,2	92±8,0 (9)	78±3,5 (6)	48±1,6 (9)	49±1,8 (6)	28±2,4 (7)
Гидрокортизон Фосфат	0,2	81±3,0 (6)	78±7,0 (6)	39±3,7 (6)	37±3,4 (6)	25±2,4 (6)

На основании этих данных можно заключить, что T_3 , T_2 и ТАА являются аллостерическими ингибиторами глутаминазы митохондриальной фракции печени.

Исследования, проведенные с глутаминазой митохондриальной фракции мозга и почек, показали, что при тепловой обработке (50° , в течение 10 мин) активность глутаминазы мозга возрастает в несколько раз, а почек полностью исчезает. Полное инактивирование мозговой глутаминазы происходит при более высокой температуре (55°). Однако даже при этой температуре фосфат, цитрат, малеат и другие эффекторы купируют тепловую инактивацию глутаминазы этих органов. Приведенные, а также ранее полученные нами результаты показывают, что глутаминазы митохондриальной фракции мозга и печени помимо того, что обладают разными регуляторными свойствами, отличаются и различной термостабильностью. Мозговая глутаминаза более термостабильна, чем печеночная. Кроме того, по-разному проявляется и протекторная роль различных активаторов при термообработке этого фермента.

Хорошо известно, что гормоны половых желез и кортикостероиды оказывают разностороннее влияние на метаболические процессы и на каталитическую активность ряда ферментов. Так, например, под действием стероидных гормонов активность аспаргаткарбамоилтрансферазы, выделенной из печени быка, повышается, а глутамат- и альдегиддегидрогеназы, напротив, подавляется [16]. В присутствии же ДЭС

активность глутаматдегидрогеназы подавляется, а альдегиддегидрогеназы, наоборот, в 2—3 раза повышается [12, 15].

Изучение глутаминазы митохондриальной фракции мозга показало, что действие ДЭС проявляется по-разному в зависимости от применяемых активаторов. Так, сравнительно низкие концентрации ДЭС не влияют на эффект фосфата, потенцируют действие цитрата, сукцината, ААК и АК и сильно подавляют стимулирующий эффект тироксина. В присутствии кортикостероидов (гидрокортизон, гидрокортизон-фосфат, гидрокортизон-ацетат, кортикостерон) стимулирующее влияние указанных активаторов не меняется [2].

Следует указать, что действие ДЭС и стероидных гормонов на активность глутаминазы не изучена. Следующую серию опытов мы посвятили изучению этого вопроса. Результаты исследований, представленные в табл. 2, показывают, что все испытанные нами гормоны оказывают слабое ингибирующее действие на эффект различных активаторов фермента. Более или менее выраженное торможение наблюдается под действием гидрокортизон-фосфата, а наименее эффективным из этих соединений является ДЭС.

Таким образом, на основании настоящих, а также ранее полученных данных можно заключить, что в регуляции активности глутаминазы мозга и печени стероидными и тиреоидными гормонами имеются принципиальные различия.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 18.VI 1979 г.

ԹԻՐԵՈՆԻԿ ԵՎ ՍՏԵՐՈՆԻԿ ՀՈՐՄՈՆՆԵՐԻ ԱԶԳԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ ԼՅԱՐԳԻ
ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱԿԱԿ ԶՐԱԿՑԻՍՅԻ ՎԼՅՈՒՏԱՄԻՆԱԶԱՅԻ ԱՆՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Վ. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Վ. Գ. ՀԱՄԲԱՐՉՈՒՄՅԱՆ

Հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ արիլոգիթիրոնինը, դիլոգիթիրոնինը և արիլոգիթիրևորացախաթթուհն զգալիորեն ճնշում են Լյարգի միտոքոնդրիակ ֆրակցիայի գլյուտամինազայի ակտիվությունը, նրա տարբեր խթանիչների առկայության դեպքում: Մակայն ֆոսֆատի ներկայությամբ անցկացված ֆերմենտի ջերմային մշակումը հանգեցնում է Լյարգի գլյուտամինազայի վերահիշյալ արգելակիչների հանդեպ ունեցած զգալունության նկատելի թուլացման:

Որոշ ստերոիդ հորմոններ և դիէթիլատիլբեստրոլը ցուցաբերում են թույլ արգելակիչ ազդեցություն ֆերմենտի մի շարք ակտիվատորների խթանիչ հատկության վրա:

THE EFFECT THYROID AND STEROID HORMONES ON GLUTAMINASE ACTIVITY OF RAT LIVER MITOCHONDRIAL FRACTION

W. S. HOVHANISSIAN, W. G. HAMBARTSUMIAN

The studies carried out have shown that 3,3',5-triiodo-L-thyronine and its analogues strongly inhibit the stimulating effect of aspartate,

succinate and maleate. Thermal treatment of mitochondrial fraction carried out in the presence of phosphate leads to the loss of enzyme sensitivity to the inhibitory effect of these combinations. Some steroid hormones produce slight inhibitory influence on stimulating effect of all tested liver glutaminase activators.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бадалян Л. Л., Бунятян Г. Х., Оганесян В. С. *Вопр. биохимии мозга*, 10, Ереван, 1975.
2. Микиртумова К. С., Айрапетян Р. Л., Оганесян В. С., Бунятян Г. Х. *Вопр. биохимии мозга*, 11, Ереван, 1976.
3. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г. *Биолог. ж. Армении*, 31, 6, 588, 1978.
4. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г. *Биолог. ж. Армении*, 32, 5, 447, 1979.
5. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж. *Вопр. биохимии мозга*, 8, 77, Ереван, 1973.
6. Оганесян В. С., Бунятян Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. Л. *Вопр. биохимии мозга*, 6, 5, Ереван, 1970.
7. Оганесян В. С., Микиртумова К. С., Бунятян Г. Х. *Вопр. биохимии мозга*, 12, 5, Ереван, 1977.
8. Huang Y. Z., Knox W. E. *Enzyme*, 21, 5, 385—480, 1976.
9. Katanuma N., Huzino A., Tomino I. *Adv in Enzyme Reg.*, 5, 55, 1967.
10. Kvamme E., Torgner A. *Biochem. J.*, 137, 525, 1974.
11. Kvamme E., Torgner A. *Biochem. J.*, 149, 83, 1975.
12. Maxwell E. S., Topper Y. J. *J. Biol. Chem.*, 236, 1032, 1961.
13. Weil-Matherbe H. J., Beall G. D. *J. Neurochem.*, 17, 1101, 1970.
14. Weil-Matherbe H. J. *J. Neurochem.*, 19, 2257, 1972.
15. Yielding K. L., Tomkins G. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 46, 1483, 1960.
16. Zak-Teresa. *Endokrynol. Pol.*, 21, 3, 341—350, 1970.