

## ВЛИЯНИЕ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАМИНАЗЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС

В. С. ОГАНЕСЯН, В. Г. АМБАРЦУМЯН

Установлено, что 3,3',5-трийод-L-тиронин, 3,5-дйод-L-тиронин, 3,3',5-трийодтиреоуксусная и 3,3',5-трийодтиреопропионовая кислоты являются сильными ингибиторами глутаминазы митохондриальной фракции печени. Ингибирующее действие этих соединений в зависимости от количества атома йода и структуры боковой цепи проявляется в различной степени. В их присутствии стимулирующий эффект фосфата подавляется значительно сильнее, чем цитрата. Повышение концентрации фосфата не снижает тормозящего действия этих соединений, между тем как с увеличением концентрации фермента этот эффект ослабляется.

Глутаминаза в животных тканях, обладая низкой каталитической активностью в отсутствие активаторов, сильно стимулируется различными соединениями как органической, так и неорганической природы. Активаторами этого фермента являются промежуточные продукты обмена, макроэрги, гормоны, коферменты и т. д. [3, 12–14, 20, 21]. Известно, что глутаминаза мозга наиболее эффективно стимулируется гормоном щитовидной железы тироксином ( $T_4$ ). При одновременном его применении с другими эффекторами фермента происходит значительное усиление их стимулирующего действия [2, 3]. Другой гормон щитовидной железы—3,3',5-трийод-L-тиронин ( $T_3$ ) и ряд его производных также стимулируют активность глутаминазы мозга, но в различной степени [4].

Следует отметить, что влияние этих соединений на активность глутаминазы печени не изучена. В связи с этим в настоящей работе мы задались целью исследовать роль тиреоидных гормонов и их аналогов в регуляции активности глутаминазы митохондриальной фракции печени.

*Материал и методика.* В качестве источника глутаминазы использовали митохондриальную фракцию печени крыс, полученную по ранее описанной методике [1]. Брали водную взвесь этой фракции, соответствующей 50, 100 и 200 мг ткани на пробу.

Инкубационная смесь содержала: 0,4 мл митохондриальной фракции, 0,5 мл 0,2 М трис-НСI буфера, рН 7,5, или 8,5, 20 мкмоль/мл L-глутамин, 40 мкмоль/мл L-глутаминовой кислоты (ГК) и различные концентрации  $T_4$ ,  $T_3$ , 3,5-дйод-L-тиронина,  $T_2$ , 3,3',5-трийодтиреоуксусной кислоты, ( $T_3УК$ ) 3,3',5-трийодпропионовой кислоты ( $T_3ПК$ ), L-тиронина, 3-йод-L-тирозина, 3,5-дйод-L-тирозина и  $J_2$ . Все перечисленные выше реактивы производства фирмы Sigma, за исключением  $T_4$  (Reanal). Об активности глутаминазы судили по выходу аммиака, который определяли по методу Зеллисона в модификации Силаковой и сотр. [6].

*Результаты и обсуждение.* В периферических тканях животных тиреоидные гормоны подвергаются многосторонним метаболическим превращениям, затрагивающим различные части структуры их молекулы. В результате этих превращений образуются как дейодированные формы гормонов, так и их аналоги с различными изменениями аланинового радикала. Не исключено, что некоторые из этих дериватов могут обладать более сильной физиологической активностью и узким диапазоном действия, чем интактные молекулы  $T_4$  и  $T_3$  [6, 15, 18]. Механизм регуляции метаболизма под действием тиреоидных гормонов многообразен. Одним из путей является их непосредственное влияние на каталитическую активность ферментов. В ряде случаев действие тиреоидных гормонов на активность ферментов носит неспецифический характер. Например, ингибирование АТФ-азы, ксантиноксидазы и малатдегидрогеназы наблюдается не только в присутствии тиреоидных гормонов, но и других йодсодержащих соединений—цианистого и молскульного йода [9, 17, 19].

В наших исследованиях испытывалось влияние на активность глутаминазы печени не только  $T_4$ ,  $T_3$ ,  $T_2$ ,  $T_3УК$ ,  $T_3ПК$ , но и 3-йод-L-тирозина, 3,5-дийод-L-тирозина и  $J_2$ . Ввиду того, что этот фермент в промытой митохондриальной фракции печени обладает очень низкой каталитической активностью, все опыты проводили в присутствии активаторов—фосфата или цитрата. Как показывают данные, приведенные в табл., испытанные нами соединения по-разному действуют на активность глутаминазы митохондриальной фракции печени. Так,  $T_4$ , имея в своей молекуле 4 атома йода, и тиронин, который вовсе не содержит йод, практически не влияют на активность фермента, стимулируемого как фосфатом, так и цитратом. В то же время  $T_2$  и различные его аналоги оказывают сильное ингибирующее действие. Наиболее эффективным среди всех использованных соединений является  $T_2$ . Ингибирующее же действие  $T_3$  заметно слабее.

Из приведенных данных следует, что тормозящее действие тиреоидных гормонов находится в прямой зависимости от содержания атома йода в их молекуле. С уменьшением количества йода усиливается ингибирующий эффект этих соединений, а полное отсутствие его приводит к исчезновению тормозящего действия.

Как выяснилось, изменение структуры аланинового радикала  $T_3$  также отражается на ингибировании активности глутаминазы. Так,  $T_3УК$  и  $T_3ПК$  намного сильнее подавляют стимулирующий эффект активаторов глутаминазы, чем сам  $T_3$  (таблица). Однако эти соединения, имея различную структуру боковой цепи, почти в одинаковой степени ингибируют активность фермента.

Из результатов, приведенных в таблице, видно, что такие дериваты  $T_4$  и  $T_3$ , как монойод и дийодтирозин, не влияют на активность глутаминазы. Эти данные показывают, что целостность тирониновой структуры в молекуле гормонов необходима для проявления их тормозящего действия.

Таблица

Влияние тироксина, трийодтиронина и его аналогов на активность глутаминазы митохондриальной фракции печени крыс ( $\text{NH}_2$ , мкмоль/г свежей ткани). pH 8,5

Добавки, мкмоль/мл		$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Цитрат
		20	20
L-тироксин	0,05	94±2,8 (35)	86±2,5 (19)
		102±5,1 (6)	89±3,8 (6)
3,3',5-триод-L-тиронин	0,1	110±6,0 (6)	94±4,2 (6)
		49±2,5 (13)	78±4,8 (6)
3,5-дйод-L-тиронин	0,025	6±2,3 (10)	65±2,4 (6)
		21±2,4 (13)	52±2,8 (13)
L-тиронин	0,05	0 (3)	21±1,6 (6)
		89±4,2 (6)	80±4,8 (6)
3,3',5-триодтиреоуксусная кислота	0,025	29±2,5 (6)	65±3,9 (6)
		4±0,1 (6)	42±2,0 (6)
3,3',5-триодтиреопропионовая кислота	0,025	25±2,2 (10)	61±4,4 (8)
		2±0,2 (6)	46±3,1 (6)
3-йод-L-тирозин	0,05	92±5,7 (6)	80±6,4 (6)
3,5 йод-L-тирозин	0,05	96±3,5 (6)	82±6,8 (6)
молекулярный йод	0,5	90±5,0 (6)	83±6,4 (6)

Существует мнение, что при действии тиреоидных гормонов высвобождаются активные йодные радикалы, которые имитируют гормональный эффект, и что гормоны действуют на различные клеточные структуры либо как интактные молекулы, либо как радикалы йода [5, 11]. Следует отметить, что молекулярный йод также воспроизводит многие эффекты тиреоидных гормонов. Учитывая это обстоятельство и тот факт, что печень обладает высокой дейодазной активностью [16], мы решили изучить влияние йода на активность глутаминазы печени. Известно, что глутаминаза печени является тиоловым ферментом [12, 22], а молекулярный йод обладает способностью блокировать SH-группы ферментов. Однако, как выяснилось из наших исследований,  $\text{I}_2$  не ингибирует активность глутаминазы печени. Следовательно, тормозящее действие тиреоидных гормонов нельзя объяснить образованием йода из их молекулы во время инкубации.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что действие  $\text{T}_3$  и его аналогов на активность глутаминазы носит специфический характер.

Результаты, представленные в таблице, показывают, что степень ингибирования под действием испытанных соединений зависит также от применяемого активатора глутаминазы. Так, если низкие концентрации  $T_2$ ,  $T_3$ ,  $T_3УК$  и  $T_3ПК$  заметно ингибируют активность фермента в присутствии фосфата, то в присутствии цитрата этот эффект незначителен. Сравнительно высокие концентрации указанных веществ (0.05 мкмоль/мл) приводят почти к полному ингибированию стимулирующего действия фосфата, между тем как эффект цитрата тормозится на 50—60%. Сильное угнетение активирующего влияния цитрата наблюдается лишь в присутствии  $T_2$ .

Известно, что кривая зависимости активности ферментов от концентрации активаторов, имея гиперболическую форму, под действием ингибитора может перейти в сигмоидную. Как видно из рис. 1, кривая

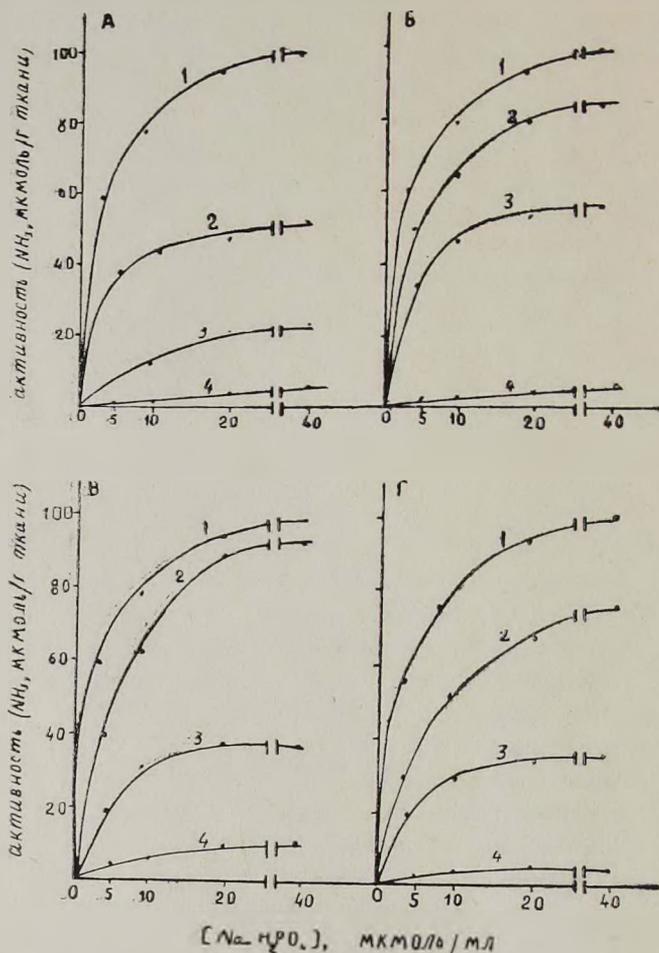


Рис. 1. Влияние  $T_2$  (А),  $T_3$  (Б),  $T_3УК$  (В) и  $T_3ПК$  (Г) на активность глутаминазы митохондриальной фракции печени, стимулируемой фосфатом. 1—фосфат без ингибитора; 2—фосфат + 0,0125 мкмоль/мл ингибитора; 3—фосфат + 0,025 мкмоль/мл ингибитора; 4—фосфат + 0,05 мкмоль/мл ингибитора.

зависимости активности глутаминазы от концентрации фосфата имеет гиперболическую форму. В присутствии возрастающих концентраций  $T_3$ ,  $T_2$ ,  $T_3$ УК и  $T_3$ ПК, хотя и происходит значительное снижение каталитической активности фермента, однако форма кривой не меняется. Из этого же рисунка видно, что значительное увеличение концентрации фосфата не ослабляет ингибирующего эффекта указанных соединений. Данные, приведенные на рис. 2, показывают, что  $I_{50}$  для  $T_2=0,0165$ , для  $T_3$ ПК= $0,0198$ , для  $T_3$ УК= $0,021$ , а для  $T_3=0,026$  мкмоль/мл.

Глутаминовая кислота сильно ингибирует активность глутаминазы мозга и почек [12]. При низких значениях рН ее ингибирующее действие на активность фермента значительно усиливается [2]. В связи с этим было изучено влияние  $T_2$  и ГК на активность глутаминазы печени при рН 7,5. Результаты, представленные на рис. 3, показывают, что при этом значении рН наблюдается некоторая тенденция к усилению тормозящего действия  $T_2$ .

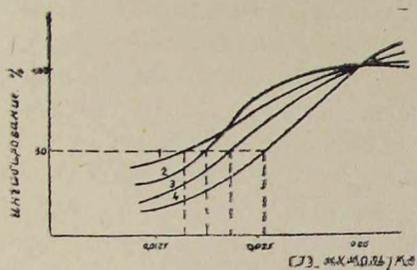


Рис. 2.

Рис. 2. Величины  $I_{50}$ . 1—для  $T_2$ ; 2— $T_3$ ПК; 3— $T_3$ УК; 4— $T_3$ .

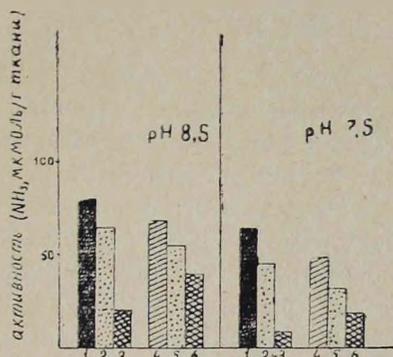


Рис. 3.

Рис. 3. Влияние  $T_2$  и ГК (40 мкмоль/мл) на активность глутаминазы печени, стимулируемой фосфатом и цитратом при разных значениях рН среды.

1—фосфат—20 мкмоль/мл; 2—фосфат+ГК; 3—фосфат+ $T_2$  (0,025 мкмоль/мл); 4—цитрат—20 мкмоль/мл; 5—цитрат+ГК; 6—цитрат+ $T_2$  (0,025 мкмоль/мл).

Примечательно, что ГК (40 мкмоль/мл) в достаточно высоких концентрациях оказывает слабое ингибирующее действие на активность глутаминазы печени. Ее эффект в зависимости от рН среды и применяемого активатора меняется лишь незначительно (рис. 3). Следует отметить, что  $T_3$  и его производные являются единственными природными соединениями, обладающими столь мощным ингибирующим действием на активность глутаминазы печени.

Далее мы исследовали эффект тиреоидных гормонов и их производных на активность глутаминазы в зависимости от концентрации фермента. Как видно из рис. 4, с увеличением количества митохондриальной фракции удельная активность глутаминазы линейно возрастает. Однако под действием  $T_3$  и  $T_2$  кривая этой зависимости из гиперболической формы переходит в сигмовидную. Можно предположить, что под действием тиреоидных гормонов меняется агрегатное состояние или же

происходит конформационная перестройка четвертичной структуры фермента, которая приводит к подавлению его активности. По всей вероятности,  $T_3$  и его аналоги являются аллостерическими ингибиторами глутаминазы митохондриальной фракции печени.

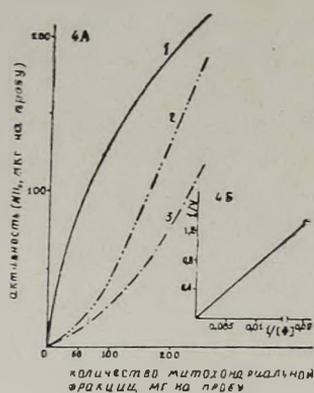


Рис. 4А. Зависимость активности глутаминазы печени от количества митохондриальной фракции в присутствии  $T_2$  и  $T_3$ . 1—фосфат—20  $\mu\text{моль/мл}$ ; 2—фосфат+ $T_3$  (0,05  $\mu\text{моль/мл}$ ); 3—фосфат+ $T_2$  (0,025  $\mu\text{моль/мл}$ ). 4Б. График двойных обратных величин зависимости активности фермента от количества митохондриальной фракции печени без ингибитора.

Из данных настоящего, а также ранее проведенных исследований выяснилось, что  $T_3$  и его производные оказывают противоположное действие на активность глутаминазы мозга и печени. Они, являясь сильными активаторами для мозговой глутаминазы, столь же сильно подавляют активность этого фермента в печени. Как показали исследования, проведенные в нашей лаборатории, тиреоидные гормоны и их аналоги активируют глутаминазу митохондриальной фракции почек и сильно потенцируют стимулирующий эффект фосфата. Очевидно, такое различие в свойствах глутаминазы мозга, печени и почек обуславливается особенностями метаболизма этих органов.

Интересно, что как тормозящее, так и стимулирующее действие  $T_3$  и его аналогов на активность глутаминазы мозга и печени подчиняется определенным закономерностям, зависящим от структуры их молекулы. Так, при уменьшении содержания йода в молекуле  $T_3$  угнетающее действие его на глутаминазу печени заметно возрастает, а стимулирующий эффект в мозге значительно снижается, между тем как различные модификации аланинового радикала  $T_3$  приводят к усилению как активирующего, так и ингибирующего эффекта их.

$T_4$  и  $T_3$  как в опытах *in vivo*, так и *in vitro* оказывают одинаковое влияние на различные метаболические процессы и активность отдельных ферментов. Примечательно, что на глутаминазу печени они действуют по-разному.

Следует отметить, что содержание  $T_4$  в организме животных значительно больше, чем  $T_3$ . В то же время в периферических тканях благодаря наличию дейодаз  $T_4$  может превращаться в  $T_3$ . Печеночная ткань, обладая очень высокой дейодазной активностью, достаточно интенсивно дейодирует  $T_4$ , а еще сильнее  $T_3$  [7, 8, 10]. Весьма вероятно, что эти превращения тиреоидных гормонов могут играть важную роль в регуляции активности глутаминазы печени.

ԹԻՐՈՒԻ ՀՈՐՄՈՆՆԵՐԻ ԵՎ ՆՐԱՆՅ ԱՇԱՆՑՅԱԼՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ  
ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԼՅԱՐԴԻ ՄԻՏՈՔՈՆՈՒՐԻԱԿԱԿԱՆՑԻ  
ԳԼՅՈՒՏԱՄԻՆԱԶՁՍՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Վ. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Վ. Գ. ՀԱՄԲԱՐՏՈՒՄՅԱՆ

Կատարված հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ 3,3',5-տրիյոդ-Լ-թիրոնինը, 3,5-դիյոդ-Լ-թիրոնինը, 3,3',5-տրիյոդթիրեոբացախաթթուն և 3,3',5-տրիյոդթիրեոպրոպիոնաթթուն համեմատաբար չնչին դոզաներով օգտագործելիս խիստ արգելակում են լյարդի գլյուտամինազայի ակտիվության խթանումը անօրդանական ֆոսֆատի և ցիտրատի կողմից: Նշված միացությունների արգելակիչ հատկությունը ավելի է ուժեղանում նրանց մոլեկուլում պարունակվող յոդի քանակության պակասեցման, ինչպես նաև ալանինային կողմնային շղթայի բարդացման հետ մեկտեղ:

Նշենք, որ 3,3',5-տրիյոդ-Լ-թիրոնինը և նրա ածանցյալները ֆոսֆատի խթանող հատկությունն ավելի ուժեղ են ճնշում, քան ցիտրատի: Ընդ որում, ֆոսֆատի քանակության ավելացումը ոչ մի ազդեցություն չի թողնում հետազոտված միացությունների արգելակող հատկության վրա, մինչդեռ միտոքոնդրիալ ֆրակցիայի քանակության ավելացման հետ մեկտեղ զգալիորեն թուլանում է նրանց կողմից լյարդի գլյուտամինազայի վրա ցուցաբերած ճնշող ազդեցությունը:

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

W. S. HOVHANNISIAN, W. G. HAMBARTSUMIAN

The obtained results have shown that glutaminase activity of rat liver mitochondrial fractions is inhibited by 3,3',5-Triiodo-L-Thyronine 3,5-diiodo-L-Thyronine, 3,3',5-Triiodothyreoacetic acid and 3,3',5-Triiodothyropropionic acid. The effect depends on the amount of iodine atoms and the structure of the molecule of the hormon. Inhibition of liver glutaminase activity is enhanced by decreasing the quantity of iodine atoms in the molecule of the thyroid hormone. 3,5,-diiodo-L-Thyronine is the strongest inhibitor of this enzyme. A high concentration of phosphate does not protect the enzyme from inhibition by Triiodo-L-Thyronine and its derivatives. The presence of large amount of liver mitochondrial fractions decreases the effect of these compounds on the activity of liver glutaminase.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г. Биолог. ж. Армения, 31, 6, 588, 1978.
2. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж. Вопросы биохимии мозга, 8, 77, Ереван, 1973.
3. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. Л. Вопросы биохимии мозга, 6, 5, Ереван, 1970.

4. Оганесян В. С., Микиртумова К. С., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, 12, 5, Ереван, 1977.
5. Рачев Р. Р., Ещечко Н. Д. Тиреоидные гормоны и субклеточные структуры. М., 1975.
6. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вопр. мед. химии, 8, 538, 1962.
7. Туракулов Я. Х. Биохимия и патология щитовидной железы. Ташкент, 1963.
8. Albert A., Klating F. R. J. Endocrinology, 51, 427, 1952.
9. Bronk J. R. Biochem. Biophys. Acta, 69, 375, 1963.
10. Frieden E. Recent Progr. Hormone Res., 23, 139, 1967.
11. Gruenstein E., Wynn J. J. Thoret. Biol., 26, 343, 1970.
12. Katunuma N., Hozino A., Tomino J. Adv. in Enzyme Res., 5, 55, 1967.
13. Kvamme E., Torgner A. Biochem. J., 137, 525, 1974.
14. Kvamme E., Torgner A. Biochem J., 149, 83, 1975.
15. Larson F. C., Albright E. C. Endocrinology, 63, 183, 1958.
16. Lissitzky S., Rogues M., Torresani J., Simon C., Bouchillout S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 16, 249, 1964.
17. Michel R., Truchot R., Tron-Loisel H., Ouignard A. M. Compt. rend Soc. Biol. 161, 1512, 1967.
18. Tata J. R., Rall J. E., Rawson R. W. Endocrinology, 60, 83, 1957.
19. Varrone S., Consiglio E., Covelli J. Europ. J. Biochem., 13, 305, 1970.
20. Weil-Malherbe H., Beall G. D. J. Neurochem., 17, 1101, 1970.
21. Weil-Malherbe H., Beall G. D. J. Neurochem., 19, 2257, 1972.
2. Yen-Zen Huang, Knox W. E. Enzyme, 21, 408, 1976.