

STRUCTURAL CHANGES IN CEREBRUM UNDER 1,4-DICHLOROBUTENE INTOXICATION

F. R. PETROSSIAN, M. S. GIHLARIAN

It has been revealed that under momentary effect with 1,4-dichlorobutene in central nervous system during the I day vessel changes and dystrophia and in posterior—necrobiosis and chromatolysis of neurons and cerebellum have been developed. In a month after the ceasing the chronic intoxication the restoration of structural disturbance mainly takes place.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коновалов Н. В. Гепато-лептикулярная дегенерация. М., 1948.
2. Крепс Е. М. В кн.: Физиология и патология дыхания, гипоксия и оксигенотерапия. Киев, 40—43, 1958.
3. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М., 1969.
4. Меркулов Г. А. Курс патогистологической техники. Л., 1969.
5. Певзнер Л. З. Докл. АН СССР, 145, 2, 447—448, 1962.
6. Поликар А., Бесси М. Элементы патологии клетки. М., 1970.
7. Смирнов Л. И. Вopr. нейрохирургии, 4, 87—89, 1954.
8. Снесарев П. Е. В кн.: Многотомное руководство по неврологии. 1, 219—263, М., 1955.
9. Струков А. И., Лапин С. К. Арх. пат., 18, 8, 21—30, 1956.
10. Струков А. И., Ярыгин Н. Е., Лапин С. К. В кн.: Вопросы морфологии нервной системы. 69—86, М., 1960.
11. Хиден Х. В кн.: Структура и функция клетки. 116—133. М., 1969.
12. Ярыгин Н. Е. Сб. научн. тр., посвящ. 10-летию Ярославского мед. ин-та, 309—316, Ярославль, 1954.
13. Klatzo J. J. Hirnforsch., 1, 47, 1954.
14. Rat J. J. Biophys. Biochem. Cytol., 8, 3. 655—673, 1960.
15. Vogt C., Vogt O. Biol. zbl., 65, 1/3, 60—61, 1946.

Биолог. жс. Армении, т. 35, № 1, 1982 г.

УДК 577.152:611.61

РАСТВОРИМАЯ ГЛУТАМИНАЗА КОРЫ ПОЧЕК КРЫС И СПЕЦИФИКА ЕЕ РЕГУЛЯЦИИ

Л. Л. БАДАЛЯН, В. С. ОГАНЕСЯН

Изучение регуляторных свойств растворимой глутаминазы почек показало, что единственным эффективным стимулятором ее активности является фосфат. Тиреоидные гормоны и их производные, а также другие модуляторы практически не влияют на активность растворимого фермента. Однако в присутствии всех испытанных тиреоидных соединений, за исключением тироксина, действие фосфата и других модуляторов многократно усиливается. Было установлено, что регуляторные свойства растворимой и митохондриальной глутаминазы почек принципиально отличаются друг от друга.

Ключевые слова: почки, глутаминаза, тиреоидные гормоны.

Глутамин в животных тканях участвует в биосинтезе ряда очень важных азотистых соединений и подвергается гидролитическому расщеплению под действием митохондриального фермента—фосфатзависимой глутаминазы (ФЗГ). Наиболее высокая глутаминазная активность обнаружена в мозговой и почечной ткани. В отсутствие активаторов глутаминаза этих органов обладает слабой каталитической активностью и стимулируется низкомолекулярными соединениями различной природы, среди которых наиболее эффективными являются макроэрги, кофакторы и гормоны [1, 5. 9—11, 17, 18].

ФЗГ, выделенная из мозга и почек свиньи, может существовать в различных взаимопревращающихся молекулярных формах. Переход одной молекулярной формы в другую осуществляется благодаря свойству фермента по-разному агрегироваться в различных буферных системах [12, 13, 15]. Детально изучены только трис-НСI, фосфатная и фосфат-боратная формы фермента. Они отличаются друг от друга по молекулярному весу и различными физико-химическими и регуляторными свойствами [12—16]. Однако в настоящее время не установлено, какая из молекулярных форм ФЗГ функционирует в клетках почечной и мозговой ткани.

В данной работе мы изучали особенности регуляции полученной нами «растворимой» глутаминазы, которая по своим регуляторным свойствам напоминает трис-НСI форму ФЗГ.

Материал и методика Исследования проводили на белых крысах массой 120—150 г. Кору почек крыс гомогенизировали в 8-ми объемах ледяной бидистиллированной воды в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в течение 4 мин. Полученный гомогенат подвергали двукратному замораживанию—оттаиванию и оставляли в замороженном состоянии на сутки при -20° . На следующий день гомогенат центрифугировали при 105000 g в течение 60 мин. Полученный супернатант использовали в качестве источника глутаминазы.

Инкубационная смесь (1,5 мл) содержала: 0,35 мл супернатанта, соответствующего 70 мг ткани, 50 мкмоль триса (трис-НСI буфер, pH 8,0), 20 мкмоль/мл L-глутамина и, в зависимости от поставленной задачи, различные сочетания активаторов в следующих концентрациях: фосфат (F_H)—6,25; 12,5 и 25 мкмоль/мл, цитрат (ЦТ), малеат (МТ), сукцинат (СК), α -кетоглутарат (КГ) и аспарат (АК)—по 50 мкмоль/мл. Растворы этих соединений предварительно доводили NaOH до pH 8,0. Концентрации тиреоидных соединений (ТС)—L-тироксина (T_4), Reanal, 3,3',5-трийодо-L-тиронина (T_3), Sigma, 3,5-дйодо-L-тиронина (T_2), Sigma, 3,3',5-трийодотиреоуксусной кислоты (T_3UK), Sigma, 3,3',5-трийодотиреопропионовой кислоты (T_3PK), Sigma, варьировали в пределах 0,0125—0,2 мкмоль/мл. Гормональные препараты растворяли добавлением NaOH (pH 10). Реакционную смесь инкубировали 15 мин при 37° , постоянно встряхивая. Реакцию останавливали добавлением 0,3 мл 10%-ной ТХУ-кислоты и центрифугировали. О глутаминазной активности судили по количеству образовавшегося аммиака, который определяли методом Зелгсона в модификации Силаковой и сотр. [8].

Результаты и обсуждение. Проведенные нами исследования показали, что после центрифугирования (105000 g) трехкратно замороженного и оттаянного гомогената коры почек крыс, приготовленного на воде, происходит высвобождение митохондриальной ФЗГ. Перешедшая в раствор глутаминаза, условно названная нами «растворимой», по своим регуляторным свойствам принципиально отличается от митохондриального фермента [7]. Изучение действия различных модуляторов на

активность растворимого фермента показало, что единственным эффективным стимулятором его активности является фосфат (рис. 1 а). Максимальная активность фермента в присутствии Φ_{II} проявляется при рН 9,0. ЦТ, СК, КГ, АК (50 мкмоль/мл), а также тиреоидные гормоны (ТГ) и их производные (0,2 мкмоль/мл), являясь достаточно эффективными стимуляторами митохондриальной ФЗГ почек, оказывают незначительное стимулирующее влияние на активность растворимого фермента. Их стимулирующий эффект составляет 0,5—6% от эффекта Φ_{II} (рис. 1 а). Среди испытанных соединений более или менее заметным активирующим действием обладает МТ.

В связи с полученными данными следует указать, что ТГ и их производные играют важную роль в процессе регуляции активности ФЗГ митохондриальной фракции мозга и почек. Их действие по целому ряду параметров отличается от действия других эффекторов [3, 4, 6]. Одной из примечательных особенностей действия гормонов является их способность потенцировать стимулирующий эффект других модуляторов этого фермента [4, 7]. Интересно, что после мягкой тепловой обработки митохондриальной фракции мозга глутаминаза полностью теряет чувствительность только по отношению к T_4 , однако одновременное его применение с другими модуляторами приводит к потенцированию их стимулирующего действия [4].

Принимая во внимание эти данные, было интересно изучить действие Φ_{II} на растворимую глутаминазу в присутствии различных ТС.

Как показывают данные, приведенные на рис. 1 (б, в, г, д), T_3 ПК, T_3 УК, T_3 и T_2 сильно потенцируют стимулирующее действие Φ_{II} . В зависимости от применяемого гормона максимальная активность глутаминазы в одних случаях наступает при низких, а в других—при более высоких их концентрациях. Так, при одновременном применении 25 мкмоль/мл Φ_{II} с T_3 ПК предельное повышение активности фермента наступает в присутствии 0,05 мкмоль/мл T_3 ПК, при этом эффект Φ_{II} усиливается в 5 раз. В аналогичных опытах с T_3 УК концентрация, при которой активность фермента достигает максимума, равна 0,1 мкмоль/мл. В этом случае происходит четырехкратное усиление действия Φ_{II} (25 мкмоль/мл). Дальнейшее увеличение количества как T_3 ПК, так и T_3 УК до 0,2 мкмоль/мл приводит к частичному подавлению эффекта потенцирования. В присутствии 0,1 мкмоль/мл T_3 и T_2 действие Φ_{II} (25 мкмоль/мл) усиливается соответственно в 3,5 и 3 раза. Однако с повышением концентрации указанных соединений до 0,2 мкмоль/мл стимулирующий эффект Φ_{II} продолжает усиливаться, а активность глутаминазы возрастает в одинаковой степени. Как видно из приведенных данных, степень потенцирования зависит и от концентраций Φ_{II} . Оказалось, что в присутствии указанных ТС сильнее всего потенцируется действие 12,5 мкмоль/мл Φ_{II} . При одновременном добавлении 0,1 мкмоль/мл T_3 ПК и 12,5 мкмоль/мл Φ_{II} активность фермента возрастает в 10 раз, а в случае применения T_3 УК, T_3 и T_2 (0,1 мкмоль/мл)—в 4—5 раз.

Примечательно, что среди испытанных гормональных препаратов наименее эффективным оказался T_4 . В его присутствии эффект 25 мкмоль/мл Φ_{II} возрастает менее чем в 2 раза, а действие низких кон-

центраций Φ_n вообще не потенцируется (рис. 1 е). В этой связи необходимо отметить, что для митохондриальной глутаминазы почек T_4 является одним из эффективных потенцирующих агентов. Кроме того, в присутствии ТС действие Φ_n на митохондриальный фермент усиливается значительно слабее, чем в опытах с растворимой глутаминазой. Так, в присутствии T_4 , T_3 ПК и др. эффект Φ_n (10 мкмоль/мл) потен-

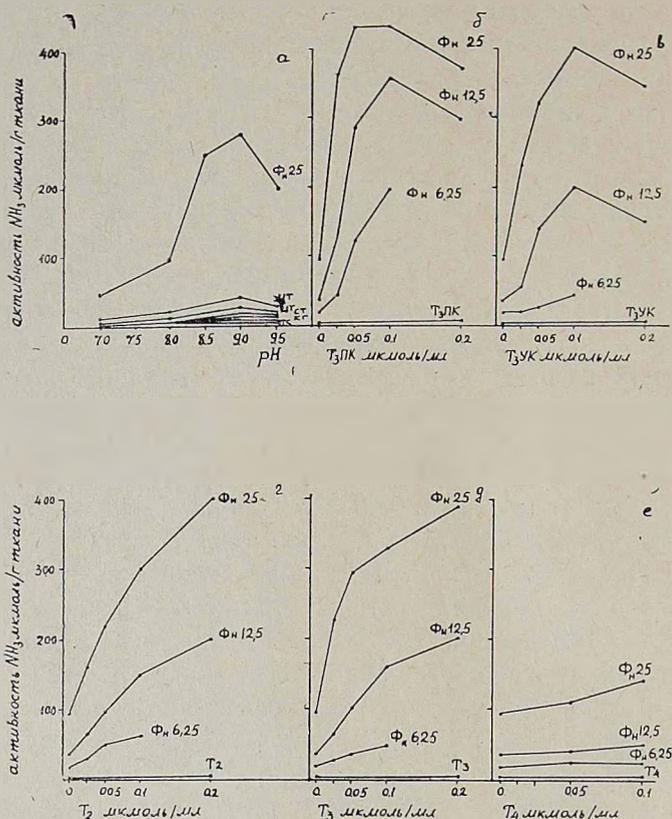


Рис. 1. а) Активность растворимой глутаминазы коры почек крыс в присутствии различных модуляторов в зависимости от рН среды. б, в, г, д, е) Действие Φ_n на активность растворимой глутаминазы коры почек крыс в присутствии различных ТС, рН 8,0.

цируется не более чем в 3 раза, между тем как в случае с растворимым ферментом наблюдается даже десятикратное усиление действия Φ_n . Однако митохондриальная глутаминаза, в отличие от растворимой, чувствительна и к низким концентрациям ТС.

В следующей серии опытов мы изучали действие МТ, ЦТ, СК, КГ и АК на активность растворимой глутаминазы в присутствии ТГ и их производных.

Как видно из рис. 2, при рН 8,0 ТС (0,1 мкмоль/мл), СК, КГ и АК (50 мкмоль/мл) практически не стимулируют активность растворимого фермента, а МТ и ЦТ (50 мкмоль/мл) оказывают слабое активирующее действие. Однако, несмотря на это, при сочетанном применении этих эффекторов с ТС активность фермента сильно возрастает и, в зависимо-

сти от применяемого модулятора, она проявляется в различной степени. В присутствии T_3 ПК, T_3 УК, T_3 и T_2 глутаминовая активность под действием МТ и ЦТ повышается значительно сильнее, чем под действием СТ, КГ и АК. Кроме того, выяснилось, что среди гормональных препаратов наиболее эффективной является T_3 ПК, в присутствии которой эффект всех испытанных модуляторов усиливается в несколько десятков раз. Многократное потенцирование действия МТ и ЦТ наблюдается и в присутствии T_5 УК. В опытах с T_2 действие МТ и ЦТ усиливается относительно слабее, а эффект СК и КГ потенцируется сильнее, чем в случае их сочетанного применения с T_3 УК. Действие этих модуляторов в присутствии T_3 выражено слабее (рис. 2 а, б, в, г).

Наряду с этим было установлено, что при одновременном применении МТ, ЦТ, СК, КГ и АК с Φ_n проявляется только лишь эффект Φ_n .

Интересно, что в присутствии T_4 стимулирующее действие указанных соединений вообще не потенцируется (рис. 2 д). Это заслуживает

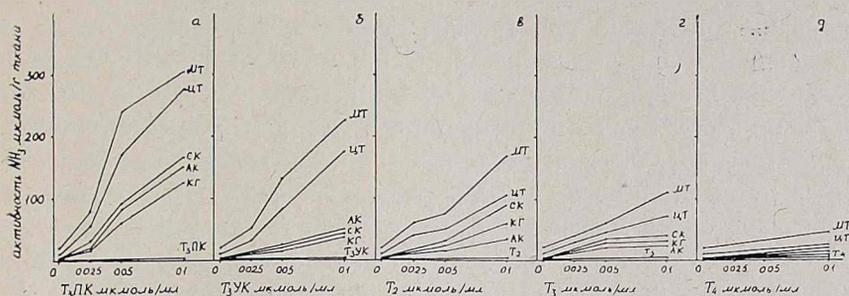


Рис. 2. Действие МТ, ЦТ, СК, КГ и АК на активность растворимой глутаминазы коры почек крыс в присутствии различных ТС, рН 8,0.

внимания в связи с тем, что в регуляции активности митохондриальной глутаминазы почек с участием этих модуляторов T_4 играет важную роль [6, 7]. Следует указать, что наиболее сильное повышение активности митохондриального фермента наблюдается при сочетании T_4 или T_3 ПК с СК и КГ, их действие усиливается в 5—6 раз, а стимулирующее действие ЦТ в присутствии любого из применяемых ТС либо потенцируется слабо, либо вовсе не потенцируется. Более или менее заметное усиление действия ЦТ наблюдается только в присутствии T_4 . Примечательно, что T_3 УК вообще не потенцирует действие ЦТ на митохондриальный фермент, а активность растворимой глутаминазы в присутствии этой пары активаторов возрастает в несколько десятков раз.

Итак, можно прийти к заключению, что регуляторные свойства митохондриальной и растворимой глутаминазы почек крыс принципиально отличаются друг от друга.

В связи с полученными данными необходимо отметить, что в цитоплазме почек крыс, в небольшом количестве, обнаружена ФЗГ, которая по своим регуляторным свойствам напоминает растворимую глутаминазу [2]. Характерной особенностью этой глутаминазы также является ее инертность по отношению к ТГ и другим эффекторам. И в этом слу-

чае T_3 повышает чувствительность фермента к Φ_n и к различным неэф-
фективным модуляторам. Весьма вероятно, что цитоплазматическая и
растворимая глутаминазы—один и тот же фермент. Однако трудно
сказать, содержится ли этот фермент в цитоплазме или же при гомоге-
низации почечной ткани в сахарозе, вследствие частичного разруше-
ния митохондрий, переходит в раствор.

Представленный выше материал наводит на мысль, что в мито-
хондриальной фракции почек крыс содержатся две молекулярные формы
глутаминазы с различными регуляторными свойствами. С другой сторо-
ны, не исключена возможность, что растворимая глутаминаза—это тот
же митохондриальный фермент, который, будучи не прочно связан со
структурными элементами или с различными белками, обладает одними
свойствами, а после замораживания—оттаивания, перейдя в раствор,
приобретает иные регуляторные свойства.

Следует отметить, что замораживание и оттаивание митохондри-
альной взвеси и гомогената почек не влияет на регуляторные свойства
глутаминазы этих препаратов. В осадке, полученном после центрифуги-
рования гомогената при 105000 g, остается фермент со свойствами
митохондриальной глутаминазы. Однако замораживание и оттаива-
ние водной взвеси осадка приводит к высвобождению новых порций
растворимого фермента с присущими ему регуляторными свойствами.
Кроме того, оказалось, что если не замораживать и размораживать вод-
ный гомогенат, то после центрифугирования выход глутаминазы в рас-
твор значительно уменьшается.

Эти данные говорят в пользу предположения, что в почечных мито-
хондриях глутаминаза непрочно связана и легко переходит в раствор,
приобретая при этом совершенно другие регуляторные свойства.

Следует отметить, что растворимая глутаминаза по своим регуля-
торным свойствам напоминает трис-HCl форму ФЗГ почек. Един-
ственным эффективным активатором этого фермента также является
 Φ_n и его максимальная активность в присутствии последнего проявля-
ется при pH 9,0. Показано, что ЦТ, СК, КГ и малат оказывают незначи-
тельное стимулирующее влияние на активность трис-HCl формы ФЗГ.
В этом случае, так же как и в опытах с растворимым ферментом, при
одновременном применении указанных соединений с Φ_n эффект потен-
цирования не наблюдается [16].

Идентична ли растворимая глутаминаза трис-HCl форме ФЗГ поч-
чек, покажут дальнейшие исследования.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 22.IV 1981 г.

ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԵՐԻԿԱՄՆԵՐԻ ԿԵՂԵՎԻ ԳՆՈՒՏԱՄԻՆԱԶԱՆ ԵՎ ՆՐԱ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Լ. Լ. ՔԱԿԱՆՅԱՆ, Վ. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

*Երիկամների լուծելի գլոտամինազայի կարգավորիչ հատկությունների ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ ֆոսֆատը այդ ֆերմենտի ակտիվու-
թյան միակ արդյունավետ խթանիչն է:*

Թիրեոիդ հորմոնները և նրանց ածանցյալները, ինչպես նաև այլ մոդուլյատորներ գործնականում չեն ազդում լուծելի ֆերմենտի ակտիվության վրա: Սակայն բացի թիրոքսինից, մնացած բոլոր փորձարկված թիրեոիդ միացությունների առկայությամբ ֆոսֆատի և այլ մոդուլյատորների ազդեցությունը ուժեղանում է բաղմամբիվ անգամ:

Ցույց է տրվում, որ երիկամների լուծելի և միտոքոնդրիալ գլուտամինազաների կարգավորիչ հատկությունները սկզբունքորեն տարբերվում են միմյանցից:

RAT KIDNEY SOLUBLE GLUTAMINASE AND SPECIFICITY OF ITS REGULATION

L. L. BADALIAN, V. S. HOVHANNISIAN

Our investigation have shown that centrifugation (105000 g) of three times repeated frozen and thawing out rat kidney water gomogenate brings passage of mitochondrial phosphate dependent glutaminase (PDG) in the soluble fraction.

Study of the regulatory properties of soluble glutaminase has shown, that phosphate is the only effective stimulator of its activity. Thyroid hormones, its derivatives and other modulators (citrate, succinate, aspartate et al.) don't effect soluble glutaminase. However in the presence of all thyroid hormones, (except thyroxine) the stimulatory effect of all modulators increases.

It has been established that regulatory properties of soluble and mitochondrial rat kidney PDG are principally distinguished.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Оганесян В. С. Докл. АН Армянской ССР, 48, 171, 1969.
2. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л. Докл. АН Армянской ССР, 69, 243, 1979.
3. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж. Вопросы биохимии мозга, 8, 77, Ереван, 1973.
4. Оганесян В. С., Бунятян Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. Л. Вопросы биохимии мозга, 6, 5, Ереван, 1970.
5. Оганесян В. С., Микиртумова К. С., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, 12, 5, Ереван, 1977.
6. Оганесян В. С., Саакян Ж. Дж., Айрапетян Р. Л., Бунятян Г. Х. Биолог. ж. Армении, 33, 932, 1980.
7. Саакян Ж. Дж., Оганесян В. С. Биолог. ж. Армении (в печати).
8. Силакова А. И., Труш Г. П., Явиллкова А. Вопросы мед. химии, 8, 538, 1962.
9. Kvamme E., Torgner I. Aa. FEBS LETTERS, 47, 244, 1974.
10. Kvamme E., Torgner I. Aa. Biochem. J., 137, 525, 1974.
11. Kvamme E., Torgner I. Aa. Biochem. J., 149, 83, 1975.
12. Kvamme E., Tveit B., Svenneby G. J. Biol. Chem., 245, 1871, 1970.
13. Svenneby G. J. Neurochem., 17, 1591, 1970.
14. Svenneby G. J. Neurochem., 18, 2201, 1971.
15. Svenneby G., Torgner J. Aa., Kvamme E. J. Neurochem., 20, 1217, 1973.
16. Svenneby G., Tveit B., Kvamme E. J. Biol., Chem., 245, 1878, 1970.
17. Weil-Malherbe H. J. Neurochem., 19, 2257, 1972.
18. Weil-Malherbe H., Beall G. D. J. Neurochem., 17, 1101, 1970.