

2. *Bonaventure N. & W'ioland N.* Docum. Ophthalm. Proc. Series, 15, 251—255, 1978.
3. *Kennedy & Voaden M. J.* J. Neurochem., 27, 131—139, 1976.
4. *Lopez-Colome A. M., Salceda R. & Pasantes-Morales H.* Neurochem. Res., 3, 431—441, 1978.
5. *Mandel P., Pasantes-Morales H. & Urban P. F.* In: Transmitters in the visual process, Pergamon Press, ed. by Bonting S. L., 89—105, 1976.
6. *Neal M. J., Collins G. G., Massey S. C.* Neuroscience Letters, 14, 241—245, 1976.
7. *Orr H. T., Cohen A. J. & Lowry O. H. J.* Neurochem, 26, 609—611, 1976.
8. *Pasantes-Morales H., Kleih J., Urban P. E. & Mandel P.* Exp. Brain Res., 19, 131—142, 1974.
9. *Salceda R., Lopez-Colome A. M. & Pasantes-Morales H.* Brain Res., 155, 186—191, 1977.
10. *Schmidt S. Y.* Exp. Eye Res., 26, 529—535, 1978.
11. *Starr M. S.* Brain Res., 151, 604—608, 1978.
12. *Voaden M. J., Marshall J. & Murani N.* Brain Res., 67, 115—132, 1974.
13. *Voaden M. J., Lake N., Marshall J. & Mcrjaria B.* Exp. Eye Res., 25, 249—257, 1977.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 4, 1982

УДК 577.152:611.61

УЧАСТИЕ РАЗЛИЧНЫХ МОДУЛЯТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ГЛУТАМИНАЗЫ ПОЧЕК И РОЛЬ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В ЭТОМ ПРОЦЕССЕ

Ж. Дж. СААҚЯՆ, В. С. ОГАНЕСЯՆ

Тиреоидные гормоны и их производные, являясь эффективными активаторами глутаминазы митохондриальной фракции почек крыс, в то же время значительно потенцируют стимулирующее действие фосфата и других модуляторов этого фермента. Эффект потенцирования проявляется в различной степени и зависит как от характера применяемых тиреоидных соединений, так и от природы второго модулятора. При сочетании применения фосфата с цитратом, сукцинатом, α -кетоглутаратом и аспаратом потенцирования не наблюдается. Тиреоидные гормоны и их производные занимают важное место в процессе регуляции активности глутаминазы почек.

Ключевые слова: глутаминаза, тиреоидные гормоны, почки.

В регуляции активности фосфатзависимой глутаминазы (ФЗГ), которая содержится во многих тканях животного организма, исключительно важное значение имеют низкомолекулярные соединения различной природы [2, 5, 7, 11—13, 15—17]. Для глутаминазы мозга и почек наиболее эффективными активаторами являются макроэрги, кофакторы и гормоны [2, 7, 11—13, 15, 17]. Действие тиреоидных гормонов (ТГ) на активность глутаминазы митохондриальной фракции мозга изучено достаточно детально. Они являются аллостерическими эффекторами и играют особую роль в процессе регуляции активности глутаминазы мозга. Примечательно, что ТГ, являясь сильными активаторами глутаминазы мозга, в то же время значительно усиливают действие фосфата (Φ_{II}) и ряда других модуляторов [4, 6, 7], между тем как под действием 3,3',5-трийодо-L-тиронина (T_3) и его производных активность печеночной глу-

таминазы, стимулируемая как Φ_{II} , так и другими эффекторами, подавляется [3].

Сравнительно недавно было показано, что в присутствии ацил-КоА производных жирных кислот стимулирующее действие Φ_{II} и цитрата (ЦТ) на активность глутаминазы как мозга, так и почек тоже усиливается [12]. Надо отметить, что ТГ и их производные являются достаточно эффективными активаторами и для глутаминазы митохондриальной фракции почек. Однако участие гормонов в процессе регуляции активности почечной глутаминазы в присутствии других модуляторов этого фермента не изучено. Выяснению этого вопроса посвящено настоящее исследование.

Материал и методика. Исследования проводили на белых крысах массой 120—150 г. В качестве источника глутаминазы использовали митохондриальную фракцию коры почек крыс, полученную по ранее описанной методике [8]. Митохондриальную взвесь готовили на 0,2 М трис-НСl буфере, рН 7,0 и рН 8,0, с таким расчетом, чтобы количество этой фракции в 0,5 мл соответствовало 50 мг ткани коры почек. Эту взвесь выдерживали в течение часа при температуре 20° или трижды замораживали и размораживали, после чего добавляли к пробам. Инкубационная смесь содержала: 0,5 мл митохондриальной фракции, 20 мкмоль/мл L-глутамин и, в зависимости от поставленной задачи, различные сочетания активаторов в концентрациях: фосфата (Φ_{II})—5, 10, 20 мкмоль/мл, цитрата (ЦТ), аспартата (АК), α -кетоглутарата (КГ), сукцината (СК)—по 25 мкмоль/мл. Растворы этих соединений предварительно доводили NaOH до рН 8,0 или рН 7,0. L-Тироксин (T_4), Reanal, 3,3',5-трийод-L-тиронин (T_3), 3,5-дийод-L-тиронин (T_2), 3,3',5-трийодтиреоуксусную кислоту ($T_3УК$), 3,3',5-трийодтиреопропионовую кислоту ($T_3ПК$) брали в различных концентрациях (T_3 и его производные получены из фирмы Sigma, США). Гормональные препараты растворяли добавлением NaOH (рН 10). Инкубационную смесь в объеме 1,5 мл инкубировали в течение 15 мин при температуре 37°, постоянно встряхивая, после чего к каждой пробе добавляли по 0,3 мл 10% ТХУ и центрифугировали. О глутаминазной активности судили по количеству образовавшегося аммиака, который определяли методом Зеллгсона в модификации Силаковой и сопр. [9].

Результаты и обсуждение. Проведенные нами исследования показывают, что при рН 8,0 сочетанное применение ТГ и их производных с Φ_{II} приводит к значительному потенцированию стимулирующего действия этих веществ на активность глутаминазы митохондриальной фракции почек. Оказалось, что в зависимости от природы тиреоидных соединений и их концентраций эффект потенцирования проявляется в различной степени, а кривая активности фермента имеет различную форму. Как видно из рис. 1, в присутствии Φ_{II} максимальная активность глутаминазы во всех опытах достигает примерно одинакового уровня, однако в одних случаях она наступает при очень низких, а в других—при достаточно высоких концентрациях тиреоидных соединений. Так, в присутствии 0,0125 мкмоль/мл $T_3ПК$ эффект 10 мкмоль/мл Φ_{II} усиливается в три раза и происходит предельное повышение активности фермента, между тем как при этой же концентрации T_2 и T_3 либо мало, либо вовсе неэффективны и только с повышением их концентрации до 0,2 мкмоль/мл наступает максимальное активирование глутаминазы. Потенцирование действия Φ_{II} в присутствии T_4 и $T_3УК$ (0,05 мкмоль/мл) более эффективно, чем в присутствии T_2 и T_3 . Концентрация, при которой происходит трехкратное усиление эффекта Φ_{II} , для T_4 и $T_3УК$ равна 0,05

мкмоль/мл. Однако с повышением их содержания активность глутаминазы в случае с $T_3УК$ заметно падает, а в случае с T_4 сохраняется на том же уровне. В опытах с $T_3ПК$ снижение активности фермента выражено более отчетливо и при ее концентрации, равной 0,2 мкмоль/мл, действие Φ_n не потенцируется. В то же время можно заметить, что неэффективная концентрация $T_3ПК$ (0,003 мкмоль/мл) заметно усиливает действие Φ_n , а остальные тиреоидные соединения при этой концентрации или не потенцируют или потенцируют очень слабо.

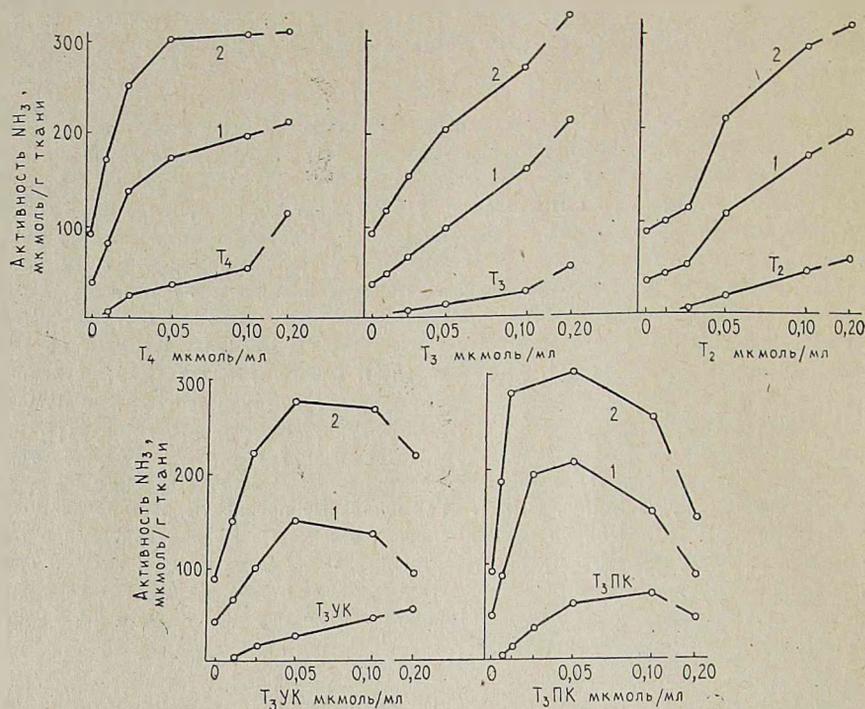


Рис. 1. Действие фосфата на активность глутаминазы митохондриальной фракции коры почек крыс в присутствии тиреоидных гормонов и их производных (рН 8,0). 1. Фосфат—5 мкмоль/мл; 2. Фосфат—10 мкмоль/мл. Крысы даны с вычетом контроля.

Представляло интерес выяснить, могут ли ТГ усиливать действие Φ_n , если они сами по себе не оказывают стимулирующего влияния на активность глутаминазы почек. С этой целью мы провели опыты при низком значении рН среды, учитывая то обстоятельство, что в этих условиях ТГ, добавленные в отдельности, не повышают активность глутаминазы [8].

Данные, приведенные на рис. 2, показывают, что при рН 7,0 под действием достаточно высоких концентраций гормонов, добавленных в отдельности, активность глутаминазы митохондриальной фракции почек практически не стимулируется. Однако, несмотря на это, в их присутствии стимулирующее действие Φ_n значительно растет. Можно заметить, что в этих условиях для максимального потенцирования необходимы более высокие концентрации ТГ. В то же время при рН 7,0 действие Φ_n потенцируется сильнее, чем при рН 8,0, а под действием высо-

ких концентраций T_3PK и T_3UK подавление активности глутаминазы выражено более отчетливо. Итак, ТГ могут усиливать действие Φ_{II} даже в тех случаях, когда они сами по себе не стимулируют активность глутаминазы. Возможно, в подобных случаях под действием гормонов происходит такая перестройка пространственной структуры глутаминазы, которая не приводит к изменению ее каталитической активности, но при этом повышает чувствительность фермента к Φ_{II} .

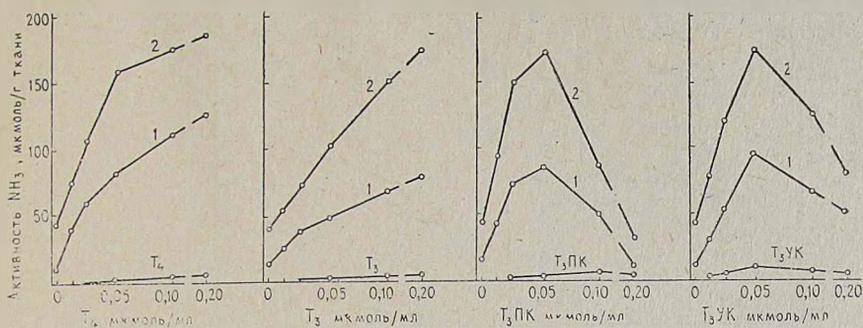


Рис. 2. Действие фосфата на активность глутаминазы митохондриальной фракции коры почек крыс в присутствии тиреоидных гормонов и их производных (рН 7,0). 1. Фосфат—10 мкмоль/мл; 2. Фосфат—20 мкмоль/мл. Кривые даны с вычетом контроля.

Полученные данные показывают, что способность ТГ усиливать действие Φ_{II} меняется при изменении структуры их молекулы. С уменьшением содержания йода в молекуле T_4 уменьшается его потенцирующий эффект, а при изменении структуры боковой цепи T_3 наблюдается двоякое действие: низкие концентрации усиливают эффект Φ_{II} , а высокие, напротив, подавляют его. Надо полагать, что модуляторы, обладающие двояким действием, могут играть важную роль в регуляции активности фермента.

Как уже было отмечено, ацил-КоА производные жирных кислот также усиливают действие Φ_{II} [12]. Однако в регуляции активности почечной глутаминазы с участием этих соединений и ТГ имеются отличия. Ацил-КоА производные жирных кислот с короткой цепью (5—10 углеродных атомов) обладают сильным потенцирующим действием только в отношении высоких концентраций Φ_{II} , между тем как в присутствии ТГ действие как высоких, так и низких концентраций Φ_{II} потенцируется в одинаковой степени. Иначе проявляется влияние ацил-КоА производных жирных кислот с длинной цепью: при низких концентрациях они потенцируют действие Φ_{II} , а при высоких—полностью подавляют его эффект. Примечательно, что даже в присутствии самых незначительных количеств этих соединений эффект низкой концентрации Φ_{II} подавляется.

Кроме того, оказалось, что действие ацил-КоА производных жирных кислот с длинной цепью проявляется при относительно низких концентрациях, т. е. глутаминаза почек более чувствительна к этим соединениям, чем к ТГ, с другой стороны, в присутствии ТГ эффект Φ_{II} потенцируется сильнее.

В следующей серии опытов мы изучали действие ТГ и их производных на активность глутаминазы почек в присутствии СК, КГ, ЦТ и АК. При рН 8,0 указанные соединения, взятые в концентрации 25 мкмоль/мл, сами по себе оказывают слабое стимулирующее действие. Результаты, приведенные на рис. 3, показывают, что при одновременном применении ТГ с этими эффекторами активность фермента значительно возрастает. Как видно из этих данных, степень повышения активности глутаминазы зависит не только от тиреоидных гормонов, но и от природы второго эффектора. Среди гормональных препаратов наиболее эффективными в

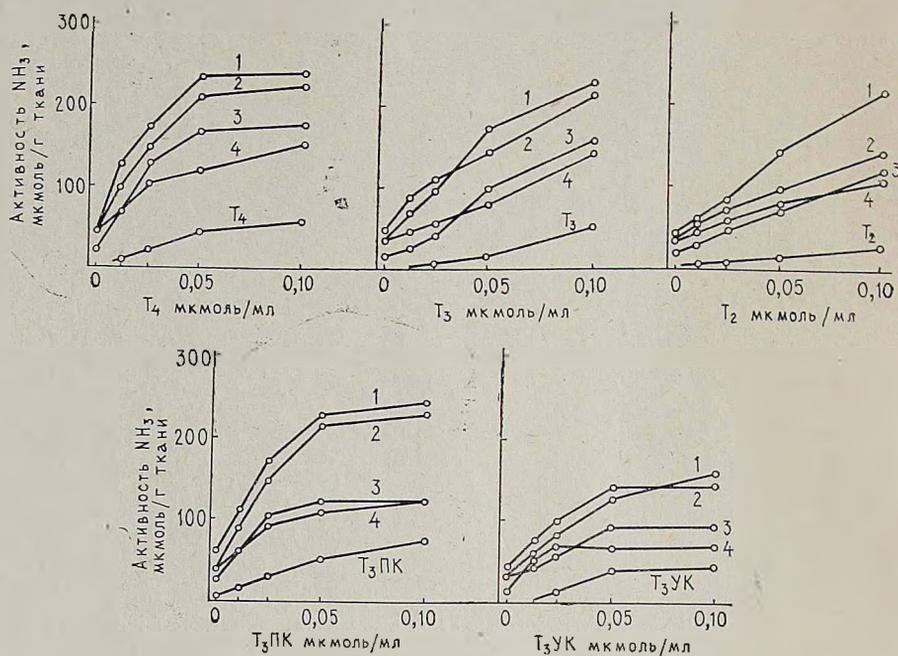


Рис. 3. Действие α -кетоглутарата (КГ), сукцината (СК), аспаргата (АК), цитрата (ЦТ) на активность глутаминазы митохондриальной фракции коры почек крыс в присутствии тиреоидных гормонов и их производных (рН 8,0). 1. КГ; 2. СК; 3. АК; 4. ЦТ, взятые в концентрации по 25 мкмоль/мл.

этом отношении являются T_4 и T_3 ПК, а наименее эффективными— T_3 УК. С другой стороны, в присутствии всех тиреоидных соединений стимулирующее действие СК и КГ потенцируется сильнее, чем действие АК и, в особенности, ЦТ. Оказалось, что в присутствии сравнительно высоких концентраций T_3 УК (0,05—0,1 мкмоль/мл) действие ЦТ вообще не потенцируется. Аналогичная картина наблюдалась и в опытах с применением 0,1 мкмоль/мл T_3 ПК. В этом случае, хотя активность фермента несколько возрастает, однако это происходит за счет суммации их эффекта, а не за счет потенцирования. Стимулирующее действие СК и КГ в достаточной степени усиливается и в присутствии T_3 , но только при применении сравнительно высоких его концентраций (0,1 мкмоль/мл), а в присутствии T_2 эффект СК по сравнению с КГ потенцируется слабее. При концентрации 0,05 мкмоль/мл T_4 и T_3 ПК усиливают действие

СК и КГ в 5—6 раз. В то же время более или менее заметное усиление эффекта АК и ЦТ наблюдается только в присутствии T_4 . Итак, выяснилось, что наиболее эффективное потенцирование действия этих модуляторов происходит в присутствии T_4 .

Было установлено, что при замораживании и оттаивании гомогената коры почек крыс часть митохондриальной глутаминазы переходит в раствор. По своим регуляторным свойствам митохондриальная и перешедшая в раствор глутаминазы во многом отличаются друг от друга [1]. Оказалось, что растворимая глутаминаза, в отличие от митохондриальной, сильно активируется только Φ_n . Тиреоидные соединения, СК, ЦТ, АК и КГ или не эффективны, или же оказывают незначительное стимулирующее действие. В то же время при одновременном применении Φ_n с тиреоидными соединениями наблюдается более сильное потенцирование, чем в опытах с митохондриальной фракцией. Исключение составляет T_4 , в присутствии которого низкие концентрации Φ_n вообще не потенцируются, а высокие усиливаются незначительно. Примечательно то обстоятельство, что активность растворимого фермента значительно повышается даже при сочетании практически неэффективных модуляторов—ЦТ, СК, АК и КГ—с тиреоидными соединениями. При этом повышение активности фермента, вызванное отдельными тиреоидными соединениями, проявляется совершенно иначе. Оказалось, что в присутствии T_4 действие СК, КГ, ЦТ и АК вообще не потенцируется, между тем как в опытах с T_3 ПК и T_3 УК стимулирующее действие ЦТ усиливается в десятки раз. Эти данные дают нам право предполагать, что в почечной ткани крыс имеются две различные молекулярные формы ФЗГ [1]. Ранее было установлено, что Φ_n усиливает стимулирующее действие других эффекторов на глутаминазу мозговой ткани [5, 16]. Исследования, проведенные с глутаминазой митохондриальной фракции почек, показали, что в присутствии Φ_n действие ЦТ, СК, АК и КГ прак-

Т а б л и ц а

Действие различных модуляторов на активность глутаминазы митохондриальной фракции коры почек крыс в присутствии фосфата (pH 8,0), мкмоль аммиака/г свежей ткани

Добавки, мкмоль/мл	Контроль	NaH_2P_4 , мкмоль/мл	
		5	10
—		50±3,7 (15)	110±6,5 (15)
Цитрат — 25	36±2,0 (10)	60±7,2 (5)	105±11,2 (5)
Сукцинат — 25	44±2,1 (8)	105±12,3 (4)	165±17 (4)
α -Кетоглутарат — 25	36±1,8 (11)	96±8,8 (5)	156±16,4 (5)
Аспаргат — 25	16±0,8 (8)	82±9,7 (4)	135±15,1 (4)

тически не потенцируется. Как видно из таблицы, при одновременном применении Φ_n с СК, АК и КГ активность фермента, хотя и повышается,

но это в основном происходит за счет суммации их эффектов. В опытах с ЦТ суммация не отмечается, а проявляется лишь эффект Φ_{11} . Следует указать, что в исследованиях, проведенных с очищенной глутаминазой почек свиньи, при сочетанном применении этих же соединений с Φ_{11} проявлялось только действие Φ_{11} [14].

Итак, выяснено, что по характеру действия ТГ отличаются от других модуляторов глутаминазы почек. Это наводит на мысль, что, возможно, в основе проявления их эффекта лежат различные молекулярные механизмы. По-видимому, перестройка конформации молекулы глутаминазы в присутствии ТГ имеет свою специфическую особенность, благодаря которой под действием другого модулятора наступает эффект потенцирования.

Таким образом, можно прийти к заключению, что феномен потенцирования, который наблюдается в присутствии ТГ, является важным звеном в сложном процессе регуляции активности глутаминазы почек.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 22.IV 1981 г.

ՏԱՐԲԵՐ ՄՈԴՈՒԼՅԱՏՈՐՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՐԻԿԱՄՆԵՐԻ ՄԻՑՈՔՈՆՏՐԻԱԿԱՆ ՖՐԱԿՑԻԱՅԻ ԳԼՈՒՏԱՄԻՆԱԶԱՅԻ ՎՐԱ ԵՎ ԹԻՐԵՈՒԴ ՀՈՐՄՈՆՆԵՐԻ ԴԵՐԸ ԱՅՎ ՊՐՈՑԵՍՈՒՄ

Ժ. Զ. ՍԱՀԱԿՅԱՆ, Վ. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍԻԱՆ

Թիրեոիդ հորմոնները և դրանց ածանցյալները հանդիսանալով սոնետներին էրիկամների միտոքոնդրիալ ֆրակցիայի գլուտամինազայի ինքնուրույն ակտիվատորներ, միաժամանակ զգալի պոտենցում են ֆոսֆատի և այդ ֆերմենտի մյուս մոդուլյատորների խթանիչ ազդեցությունը:

Պոտենցման էֆեկտը դրսևորվում է տարբեր չափով և կախված է ինչպես կիրառվող թիրեոիդ հորմոնների, այնպես էլ երկրորդ մոդուլյատորի բնույթից: Սակայն նման էֆեկտ չի նկատվում ֆոսֆատը՝ ցիտրատի, սուլֆիդի, α -կետոգլուտարատի և ասպարտատի հետ համատեղ կիրառման դեպքում:

Թիրեոիդ հորմոնները և դրանց ածանցյալները կարևոր տեղ են գրավում էրիկամների գլուտամինազայի ակտիվության կարգավորման պրոցեսում:

EFFECT OF DIFFERENT MODULATORS ON THE ACTIVITY OF RAT KIDNEY MITOCHONDRIAL GLUTAMINASE AND ROLE OF THYROID HORMONES IN THIS PROCESS

J. J. SAHAGIAN, V. S. HOVHANNISIAN

Thyroid hormones and their derivatives being independent activators of rat kidney mitochondrial glutaminase at the same time significantly potentiate the stimulating effect of phosphate and other modulators of this enzyme.

The potentiation effect is revealed at various degree and depends both on the character of thyroid compounds applied and on the nature of the second modulator.

However joint addition of phosphate cytrate, succinate, -ketoglutarate and aspartate dont lead to intensification of stimulatory effect of these activators.

Thyroid hormones and their derivatives play important role in the regulation of renal glutaminase.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бадалян Л. Л., Оганесян В. С. Биолог. ж. Армении, 35, 29, 1982.
2. Оганесян В. С. Докл. АН Армянской ССР, 48, 171, 1969.
3. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г. Биолог. ж. Армении, 32, 477, 1979.
4. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж. Вопросы биохимии мозга, 8, 77, Ереван, 1973.
5. Оганесян В. С., Бунятян Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. Л. Вопросы биохимии мозга, 5, 5, Ереван, 1969.
6. Оганесян В. С., Бунятян Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. Л. Вопросы биохимии мозга, 6, 5, Ереван, 1970.
7. Оганесян В. С., Микиртумова К. С., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, 12, 5, Ереван, 1977.
8. Оганесян В. С., Саакян Ж. Дж., Айрапетян Р. Л., Бунятян Г. Х. Биолог. ж. Армении, 9, 932, 1980.
9. Силакова А. И., Труш Г. П., Являева А. Вопросы мед. химии, 8, 538, 1962.
10. Katunuma N., Katsunuma T., Tomino J. and Matsuda J. Adv. Enzyme Reg., 6, 227, 1968.
11. Kvamme E., Torgner J. Aa. FEBS Letters, 47, 244, 1974.
12. Kvamme E., Torgner J. Aa. Biochem. J., 149, 83, 1975.
13. Kvamme E., Torgner J. Aa. Biochem. J., 137, 525, 1974.
14. Svenneby S., Tveit B. and Kvamme E. J, Biol. Chem., 245, 1871, 1970.
15. Weil-Malherbe H. J. Neurochem., 19, 2257, 1972.
16. Weil-Malherbe H. J. Neurochem., 16, 855, 1969.
17. Weil-Malherbe H. and Beall I. D. J. Neurochem., 17, 1101, 1970.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 4, 1982

УДК 577.158.347

КОНФОРМАЦИОННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗ ИЗ МОЗГА И ПЕЧЕНИ

Р. А. КАЗАРЯН, А. А. ПОГОСЯН, Қ. А. МАРТИРОСЯН, Л. В. КАРАБАШЯН

Методом изотермической денатурации мочевиной изучена конформационная устойчивость глутаматдегидрогеназ из печени и мозга крыс и крупного рогатого скота. Показано, что ферменты из печени и мозга крупного рогатого скота более устойчивы к денатурирующему воздействию мочевины по сравнению с таковыми крыс. Вместе с тем, ферменты одного и того же животного не различаются по конформационной устойчивости.

Ключевые слова: глутаматдегидрогеназа, конформация.

В настоящее время установлено, что глутаматдегидрогеназы из органов разных млекопитающих отличаются друг от друга рядом физико-химических и каталитических свойств. Известно, что каталитически ак-