

PECULIARITIES OF DEVELOPMENT OF TRANSCALLOSAL POTENTIALS IN POSTNATAL ONTOGENESIS OF KITTENS

T. G. URGANDJIAN, L. A. GASPARIAN, R. M. VOSKANIAN

Peculiarities of origin, development and topography of the evoked transcallosal potentials have been studied in acute experiments. It has been shown that the origination of transcallosal potentials in postnatal ontogenesis is displayed in the shape of a negative wave in suprasylvian gyrus with a latency of 60—70 ms. The first positive wave appears on the 5—7th day, while complete maturation of transcallosal potentials takes place on the 45th day. It has also been shown that the difference in time during which transcallosal potentials are getting mature is connected with heterochronic development of kitten cerebral cortex.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Анохин П. К. Физиол. журн. СССР, 50, 773, 1964.
2. Ата-Мурадова Ф. А. Автореф. дисс., М., 1963.
3. Баклаваджян О. Г., Адамян Ф. А. Физиол. журн. СССР, 49, 269, 1963.
4. Данилевский В. Я. Первые отечественные исследования по ЭЭГ, М., 1949.
5. Дзидзишвили Н. Н., Джавришвили Т. Г. Физиол. журн. СССР, 47, 559, 1961.
6. Карамян А. И. Ж. эвол. биохим. и физиол., 2, 232, 1966.
7. Максимова Е. В. Функциональное созревание неокортекса в пренатальном онтогенезе. М., 1979.
8. Мурова Л. С. Ж. эвол. биохимии и физиол., 1, 366, 1965.
9. Полякова А. Г. Нейрофизиология, 2, 399, 1970.
10. Урганджян Т. Г., Гаспарян Л. А. Третий съезд арм. физиолог. общества, Ереван, 1979.
11. Фарбер Д. А. Функциональное созревание мозга в раннем онтогенезе, М., 1969.
12. Grafstein B. J. Neurophysiol., 22, 501, 1959.
13. Grossman C. Arch. Neurol. Psychiat., 74, 1955.
14. Hatotani N., Timiras Paola S. Neuroendocrinol., 2, 147, 1967.
15. Petrescu G. C. R. Soc. Biol., 174, 280, 1980.
16. Purpura D. P. In: Nervous Inhibition. Oxford, 1961.
17. Scharer F., Oeconomus B. Etude neonatales, 3, 199, 1954.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 1, 1983

УДК 577.152:611.41

УЧАСТИЕ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЛУТАМИНАЗЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС

В. С. ОГАНЕСЯН, Р. Л. АЙРАПЕТЯН

Установлено, что тиреоидные гормоны являются эффективными активаторами глутаминазы митохондриальной фракции селезенки крыс и играют важную роль в регуляции ее активности. Полученные данные показывают, что регуляторные свойства

глутаминазы селезенки во многом отличаются от свойств глутаминазы мозга, почек и печени.

Ключевые слова: глутаминаза, тиреоидные гормоны, глутамат, селезенка.

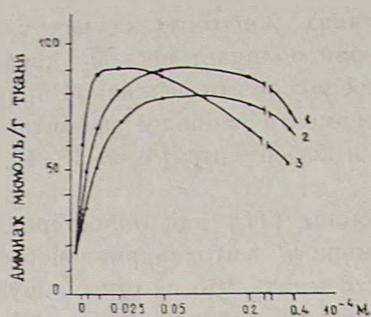
Деамидирование глутамина в органах животных осуществляется фосфатзависимой глутаминазой, которая обладает низкой каталитической активностью и стимулируется соединениями различной природы. Среди множества активаторов этого фермента наиболее эффективными являются фосфат, гормоны, макроэрги и коферменты [4—8, 13, 14, 16—18, 20, 21].

Установлено, что тиреоидные гормоны (ТГ) как аллостерические эффекторы сильно активируют глутаминазу митохондриальной фракции мозга и почек крыс [5—7]. Надо отметить, что их стимулирующее действие по ряду параметров принципиально отличается от действия других эффекторов глутаминазы и что эти гормоны занимают центральное место в процессе регуляции активности мозгового и почечного фермента [4, 7, 9]. Наряду с этим было показано, что на активность глутаминазы митохондриальной фракции печени ТГ действуют иначе. Так, L-тироксин (T_4) не влияет, а 3,3',5-трийодо-L-тиронин (T_3) и его производные сильно подавляют активность печеночного фермента [3]. В то же время влияние ТГ на активность глутаминазы селезенки не изучено; в настоящей работе нашей целью являлось изучение этого вопроса.

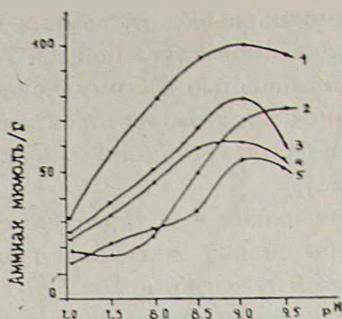
Материал и методика. В качестве источника глутаминазы использовали митохондриальную фракцию, полученную из селезенки зрелых крыс. Селезенку сразу после промывания холодным раствором сахарозы и удаления пленки гомогенизировали в 9 объемах 0,25 М раствора сахарозы (рН 7,4) в течение 3 мин. Затем центрифугированием гомогената при 600 г в течение 8 мин осаждали ядра; их снова гомогенизировали в этих же условиях и отбирали промывную жидкость. Для выделения митохондриальной фракции надосадочную жидкость вместе с промывной жидкостью центрифугировали при 13000 г в течение 20 мин. Из полученной митохондриальной фракции, которую промывали один раз в двойном объеме сахарозы, готовили взвесь на 0,2 М трис-НСI буфере с таким расчетом, чтобы количество этой фракции в 0,5 мл соответствовало 100 мг ткани. Митохондриальную взвесь выдерживали в течение 30 мин при 20° и добавляли к пробам. Инкубационная смесь содержала 0,5 мл митохондриальной взвеси, L-глутамин— $2 \cdot 10^{-2}$ М и различные концентрации активаторов: T_4 (Reanal), T_3 (Sigma), 3,3',5-трийодтиреоксусная кислота (T_3 УК) (Sigma), 3,3',5-трийодтиреопропионовая кислота (T_3 ПК) (Sigma) и фосфат. рН этих соединений предварительно доводили NaOH до необходимой величины. Объем реакционной смеси после всех добавок доводили до 1,5 мл и инкубировали 30 мин при 37°, постоянно встряхивая, после чего к каждой пробе добавляли 0,3 мл 10% ТХУ и центрифугировали. Глутаминазную активность определяли по количеству образовавшегося аммиака, который определяли методом Зелигсона в модификации Силаковой и сотр. [10].

Результаты и обсуждение. Как показывают, проведенные нами исследования (рис. 1), под действием T_4 , T_3 и T_3 ПК активность глутаминазы митохондриальной фракции селезенки повышается в несколько раз, однако в зависимости от применяемого активатора, а также от его концентрации повышение активности фермента происходит в различной степени. Отчетливые различия в стимулирующем действии тиреоидных соединений наблюдаются при применении их низких концен-

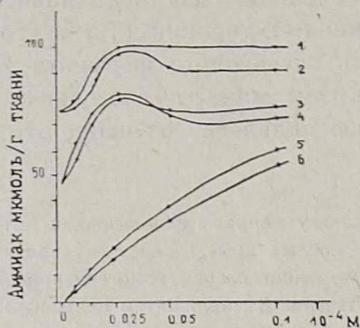
траций. Так, в присутствии $2.5 \cdot 10^{-5}$ М Т₃ПК активность глутаминазы селезенки повышается в пять раз и достигает максимального уровня. В то же время под действием этой же концентрации Т₄ и Т₃ она усили-



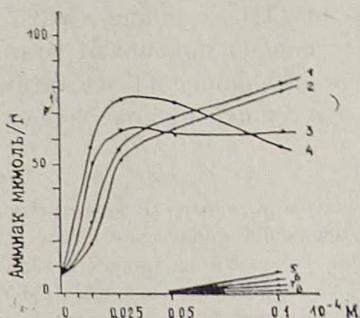
1



2



3



4

Рис. 1. Активность глутаминазы митохондриальной фракции селезенки в зависимости от концентрации эфекторов (рН 8,5). 1. Т₃; 2. Т₄; 3. Т₃ПК.

Рис. 2. Влияние различных активаторов на активность глутаминазы митохондриальной фракции селезенки в зависимости от рН среды. 1. Фосфат 10^{-2} М; 2. Т₃ПК $2 \cdot 10^{-4}$ М; 3. Т₃ $2 \cdot 10^{-4}$ М; 4. Т₄ $2 \cdot 10^{-4}$ М; 5. Т₃УК $2 \cdot 10^{-4}$ М.

Рис. 3. Влияние тиреоидных гормонов на активность глутаминазы митохондриальной фракции селезенки в присутствии фосфата (рН 8,0). 1. Т₃ + фосфат 10^{-2} М; 2. Т₄ + фосфат 10^{-2} М; 3. Т₃ + фосфат $5 \cdot 10^{-3}$ М; 4. Т₄ + фосфат $5 \cdot 10^{-3}$ М; 5. Т₃; 6. Т₄.

Рис. 4. Действие глутамата ($1 \cdot 10^{-4}$ М) на активность глутаминазы митохондриальной фракции селезенки при сочетанном применении тиреоидных гормонов с фосфатом (рН 8,0). 1. Т₄ + фосфат $2 \cdot 10^{-2}$ М; 2. Т₃ + фосфат $2 \cdot 10^{-2}$ М; 3. Т₃УК + фосфат $2 \cdot 10^{-2}$ М; 4. Т₃ПК + фосфат $2 \cdot 10^{-2}$ М; 5. Т₄; 6. Т₃ПК; 7. Т₃; 8. Т₃ УК.

вается всего лишь в 2—2,5 раза, а с повышением их содержания до 10^{-4} М активность фермента возрастает в 4—5 раз и наблюдается максимальное повышение скорости глутаминазной реакции. Надо отметить,

что даже в присутствии $6 \cdot 10^{-6}$ М T_3 ПК происходит заметное активирование глутаминазы, между тем как T_4 и T_3 при этой концентрации неэффективны. Увеличение концентрации T_2 ПК до 10^{-4} М, а T_4 и T_3 до $2 \cdot 10^{-4}$ М не приводит к изменению активности фермента, но при дальнейшем повышении их содержания скорость реакции заметно снижается. Итак, выяснилось, что наиболее эффективным активатором глутаминазы селезенки является T_2 ПК, а наименее— T_4 ; следует отметить, что максимальная скорость глутаминазной реакции почек, наблюдаемая в присутствии T_4 , заметно выше, чем в присутствии T_3 ПК [7].

Известно, что оптимум рН глутаминазной реакции в различных органах колеблется в пределах 7,5—9,5 [2, 19]. В присутствии фосфата оптимум рН для фосфат-боратной и фосфатной форм глутаминазы почек лежит в пределах 8,0—9,5, а для трис формы фермента максимальная активность проявляется при рН 9,0 [19]. Показано, что глутаминаза митохондриальной фракции почек крыс в зависимости от применяемого активатора (T_4 , T_2 , T_3 УК и T_3 ПК) имеет различный оптимум рН. Нашими исследованиями установлено, что стимулирующее действие ТГ и их производных, а также фосфата на активность глутаминазы митохондриальной фракции селезенки усиливается с повышением рН среды (рис. 2). Во всех случаях минимальная активность фермента наблюдается при рН 7,0, а максимальная—при различных значениях рН. Так, в случае применения T_4 и фосфата оптимум рН глутаминазы лежит в пределах 8,5—9,0, а в присутствии T_3 рН равен 9,0. Под действием T_3 УК и T_3 ПК активность глутаминазы при рН от 7,0 до 8,0 меняется незначительно и достигает максимального уровня при рН 9,0—9,5. Из этих опытов выяснилось, что глутаминаза митохондриальной фракции селезенки, так же как и почек, в зависимости от применяемого активатора имеет различный оптимум рН. В то же время обнаруженные закономерности для фермента почек и селезенки имеют и некоторые отличительные особенности.

Процесс регуляции активности глутаминазы почек и мозга носит сложный и поливалентный характер. Одним из примечательных регуляторных свойств этого фермента является то, что при одновременном применении двух различных активаторов происходит не суммация, а значительное усиление их стимулирующего действия [5—7, 9]. Так, в присутствии ТГ эффект фосфата и других модуляторов на активность почечной и мозговой глутаминазы возрастает в несколько раз. В связи с этим представляло интерес изучение особенности регуляции активности глутаминазы селезенки в присутствии двух различных активаторов. Данные, представленные на рис. 3, показывают, что при сочетанном применении низких концентраций T_4 и T_3 как с $5 \cdot 10^{-3}$ М, так и с 10^{-2} М фосфата происходит суммация их активирующего эффекта, однако при применении сравнительно высоких концентраций гормонов суммации уже не наблюдается. В этом случае сумма эффекта каждого активатора, добавленного в отдельности, намного выше, чем эффект от их одновременного применения. Итак, под действием сочетанного применения ТГ с фосфатом на глутаминазу селезенки потенцирования их эффекта не происходит; следовательно, регуляторные свойства глу-

таминазы селезенки в этом отношении принципиально отличаются от таковых мозгового и почечного фермента.

Известно, что глутамат сильно подавляет активность глутаминазы почек и мозга, стимулируемой различными активаторами [4, 11, 12, 14]. Наряду с этим было установлено, что в случае сочетанного применения ТГ и фосфата тормозящее действие глутамата на активность глутаминазы мозга и почек сводится на нет, а эффект потенцирования многократно усиливается [1].

В следующей серии опытов мы исследовали влияние сочетанного применения ТГ, фосфата и глутамата на активность глутаминазы митохондриальной фракции селезенки. Данные, приведенные на рис. 4, показывают, что стимулирующее влияние $2 \cdot 10^{-2}$ М фосфата, так же как ТГ и их производных, добавленных в отдельности, под действием глутамата ($4 \cdot 10^{-2}$ М) сильно подавляется. В то же время при сочетанном применении глутамата, ТГ и фосфата наблюдается значительное повышение активности фермента. Даже в случае полного торможения действия гормонов эффект фосфата многократно возрастает. Как видно из рис. 4, при добавлении $2,5 \cdot 10^{-5}$ М тиреоидных соединений действие фосфата в присутствии глутамата усиливается в 10—15 раз. При той же концентрации гормонов наиболее эффективное потенцирование действия фосфата происходит в присутствии T_3 ПК. Примечательно то, что даже при применении $6 \cdot 10^{-6}$ М T_3 УК и T_3 ПК эффект фосфата усиливается в 5—6 раз. Однако с повышением концентрации T_3 ПК до 10^{-4} М активность фермента снижается, а при применении 10^{-4} М T_1 и T_3 , напротив, повышается. На основании этих данных можно прийти к заключению, что глутаминаза митохондриальной фракции селезенки, так же как и глутаминаза мозга и почек, может функционировать в присутствии высоких концентраций ингибитора этого фермента—глутамата.

Таким образом, в отсутствие глутамата между эффектами ТГ и фосфата не происходит положительного кооперативного взаимодействия, между тем как оно отчетливо проявляется при подавлении стимулирующего влияния этих соединений под действием глутамата. По-видимому, вследствие этого снимается тормозящее действие ингибитора. Можно думать, что в присутствии гормона и фосфата, добавленных в отдельности, конформационные сдвиги, наступающие в молекуле глутаминазы, не меняют ее чувствительности к тормозящему действию глутамата, а при сочетанном применении гормонов с фосфатом происходит такая перестройка четвертичной структуры фермента, при которой действие глутамата не проявляется.

Ранее нами было показано, что при различных значениях pH в зависимости от применяемого активатора действие глутамата на активность глутаминазы мозга носит разнонаправленный характер [4]. Аналогичные результаты получены и в исследованиях, проведенных с глутаминазой почек. В связи с этим представляло интерес изучение характера действия глутамата на глутаминазу митохондриальной фракции селезенки в зависимости от pH среды (табл.). Как показывают данные, приведенные в табл., при pH 8,0 глутамат ($4 \cdot 10^{-2}$ М) одинаково

Действие глутамата на активность глутаминазы митохондриальной фракции селезенки в зависимости от pH среды (аимиак мкмоль г свежей ткани)

Добавки	Значения pH среды			
	8,0	8,5	9,0	9,5
L-тироксин 10^{-4} М	$50 \pm 2,5$ (21)	$60 \pm 1,33$ (5)	$75 \pm 6,4$ (11)	$80 \pm 6,47$ (6)
L-тироксин 10^{-4} М + глутамат $4 \cdot 10^{-2}$ М	$9 \pm 1,82$ (9)	$40 \pm 3,63$ (5)	$75 \pm 7,4$ (5)	$85 \pm 5,93$ (6)
3,3,5-трийодо-L-тиронин 10^{-4} М	$48 \pm 3,4$ (24)	$70 \pm 5,46$ (5)	$90 \pm 9,14$ (5)	$80 \pm 9,0$ (7)
3,3,5-трийодо-L-тиронин 10^{-4} М + глутамат $4 \cdot 10^{-2}$ М	$6 \pm 1,08$ (9)	$20 \pm 4,85$ (5)	$85 \pm 3,9$ (7)	$85 \pm 6,86$ (5)
Фосфат 10^{-2} М	$77 \pm 3,73$ (19)	$103 \pm 9,72$ (5)	$110 \pm 10,5$ (5)	$100 \pm 11,1$ (5)
Фосфат 10^{-2} М + глутамат $4 \cdot 10^{-2}$ М	$3 \pm 0,8$ (5)	$42 \pm 5,2$ (5)	$103 \pm 11,7$ (5)	$100 \pm 12,2$ (5)

но сильно подавляет активность фермента, стимулируемого как ТГ, так и фосфатом. При pH 8,5 его тормозящее действие заметно уменьшается, а с повышением pH среды до 9,0—9,5 ингибирующее влияние глутамата на фермент, активируемый ТГ и фосфатом, полностью исчезает. Из этих опытов выяснилось, что при различных значениях pH глутамат оказывает одностороннее действие на активность глутаминазы селезенки. Интересно отметить, что в аналогичных условиях действие глутамата на глутаминазу мозга и почек подчиняется совершенно иным закономерностям. Хотя при низком значении pH под действием глутамата влияние ТГ и фосфата на глутаминазу мозга и почек также сильно подавляется, однако с повышением pH среды (9,0—9,5) эффект ТГ не только не подавляется, а, напротив, усиливается в несколько раз.

Из вышеизложенного следует, что ТГ играют важную роль в регуляции активности глутаминазы митохондриальной фракции селезенки и что регуляторные свойства этого фермента во многом отличаются от свойств глутаминазы мозга, почек и печени.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 14.III 1982 г.

ԹԻՐԵՈՒԴ ՀՈՐՄՈՆՆԵՐԻ ՄԱՍՆԱԿՑՈՒԹՅՈՒՆՆ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՓԱՅՄԱԳԻ ՄԻՏՈՔՈՆԴՐԻԱԿԱԼ ՖՐԱԿՑԻԱՅԻ ԳԼՈՒՏԱՄԻՆԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆԸ

Վ. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Հ. Լ. ՀԱՅՐԱՊԵՏՅԱՆ

Հաստատվել է, որ թիրեոիդ հորմոնները հանդիսանում են առնետների փայծաղի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայի գլուտամինազայի էֆեկտիվ ակտիվատորներ: Ստացված տվյալները ցույց են տվել, որ փայծաղի գլուտամինազան իր կարգավորիչ հատկություններով տարբերվում է ուղեղի, երիկամների և լյարդի գլուտամինազայից:

PARTICIPATION OF THYROID HORMONES IN THE PROCESS OF ACTIVITY REGULATION OF GLUTAMINASE OF RAT SPLEEN MITOCHONDRIAL FRACTION

V. S. HOVHANNISIAN, H. L. HAIRAPETIAN

Thyroid hormones have been ascertained to be effective activators of rat spleen mitochondrial fraction glutaminase. The obtained data show that the regulatory properties of spleen glutaminase differ from those of brain, kidney and liver glutaminase.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бадалян Л. Л., Бунятян Г. Х., Оганесян В. С. Вопросы биохимии мозга, 10, 40, Ереван, 1975.
2. Козлов Е. А., Коваленко Н. А. Успехи биологич. химии, 13, 49, 1972.
3. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г. Биолог. ж. Армении, 32, 5, 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, 6, 5, Ереван, 1970.
6. Оганесян В. С., Микиртумова К. С., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, 12, 5, Ереван, 1977.
7. Оганесян В. С., Саакян Ж. Дж., Айрапетян Р. Л., Бунятян Г. Х. Биолог. ж. Армении, 33, 932, 1980.
8. Оганесян В. С. ДАН АрмССР, 48, 171, 1969.
9. Саакян Ж. Дж., Оганесян В. С. Биолог. ж. Армении, 35, 4, 264, 1982.
10. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вопросы мед. химии, 8, 538, 1962.
11. Blumson N. L. Biochem. J., 65, 138, 1957.
12. Katunuma N., Hurino A. and Tomino J. Adv. in Enzyme Reg., 5, 55, 1967.
13. Katunuma N., Tomino J., Nishino H. Biochem. and Biophys. Res. Comm., 22, 321, 1966.
14. Katunuma N., Katsunuma T., Tomino J. and Matsuda J. Adv. Enzyme Reg., 6, 227, 1967.
15. Krebs H. A. Biochem. J., 29, 1951, 1937.
16. Kvamme E., Torgner J. Biochem. J., 3, 525, 1974.
17. Kvamme E., Torgner J. FEBS Letters, 2, 47, 1974.
18. Kvamme E., Torgner J. Biochem. J., 83, 194, 1975.
19. Kvamme E., Tveit Band Svanneby G. Biol. Chem., 245, 1871, 1970.
20. Well-Malherb H., Beall G. J. Neurochem., 17, 1101, 1970.
21. Well-Malherb H. J. Neurochem., 19, 1972.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 1, 1983

УДК 612.45.578.087.9

ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОРТИКОСТЕРОНА И КОРТИЗОЛА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

П. С. СИМВОРЯН, Э. А. ШИРИНЯН, М. В. ОВСЕПЯН

Предложен новый метод флуорометрического дифференцированного определения кортикостерона и кортизола в присутствии флуорогенных веществ в биологическом ма-