

12. Limber G. K., Davis R. F., Bakerman. Blood, 36, 111, 1970.
13. Lowry O. H., Rosenbrengh A., Beer K., Raymond F. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.

«Биолог. ж. Армения», т. XXXVIII. № 5, 1985

УДК 577.15+577.3+591.39

ВЛИЯНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ИЗОЦИТРАТА НА АКТИВНОСТЬ НАДФ-ЗАВИСИМОЙ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ТКАНЯХ КУР

Р. А. СИМОНЯН, Л. А. АРУТЮНЯН, А. А. СИМОНЯН

Изучали влияние цитрата, пирувата и оксалоацетата на активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы в цитоплазме и митохондриях мозга и печени кур в процессе онтогенетического развития. Показано, что активность фермента в тканях кур стимулируют низкие концентрации цитрата и пирувата и высокие концентрации оксалоацетата. Активирующее воздействие использованных эффекторов проявляется заметнее на ранних стадиях онтогенеза.

Ключевые слова: куры, изоцитратдегидрогеназа, цитрат, пируват, оксалоацетат, онтогенез.

В проведенных нами ранее исследованиях были выявлены некоторые закономерности становления НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДФ-ИДГ) в онтогенезе кур, в частности, четкая зависимость динамики активности фермента от вида ткани и стадий ее морфофункциональной дифференциации [1]. Естественно было задаться вопросом о влиянии на течение изоцитратдегидрогеназной реакции различных соединений, уровень которых изменяется в ходе индивидуального развития. К настоящему времени нет данных, касающихся роли различных регуляторных факторов в метаболизме изоцитрата в тканях кур, в связи с чем представлялось интересным изучить особенности их влияния на НАДФ-ИДГ в ходе онтогенеза.

Выяснение роли различных эффекторов в системе контроля над активностью НАДФ-ИДГ мы начали с предшественников изоцитрата: цитрата, пирувата и оксалоацетата. В настоящей работе приводятся результаты этих исследований.

Материал и методика. Работа выполнена в лаборатории эмбриологии Института биологии АН Армянской ССР. Опыты проводили на мозговой и печеночной тканях 20-дневных эмбрионов (стадия вылупления), 5-дневных цыплят (ранний постэмбриональный период) и зрелых кур. Цитоплазматическую и митохондриальную фракции тканей получали описанным ранее методом; активность НАДФ-ИДГ определяли спектрофотометрически и выражали в мкмольх НАДФН/мг белка/мин [1].

Инкубационная смесь содержала 50 мМ трис-НСI буфера (рН 8,5), 2 мМ $MnCl_2$, 0,2 мМ ЭДТА, 1 мМ НАДФ, 2 мМ изоцитрата и различные концентрации цитрата, пирувата или оксалоацетата.

Результаты и обсуждение. В первой серии опытов исследовали влияние цитрата на активность цитоплазматической и митохондриальной

НАДФ-ИДГ в тканях кур. Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что добавление цитрата приводит к повышению активности НАДФ-ИДГ, возрастающему по мере снижения его концентрации. Влияние цитрата на активность фермента в обеих фракциях изученных тканей больше выражено в конце эмбриональной и начале постэмбриональной стадий развития. С возрастом активирующее действие цитрата снижается в цитоплазме и митохондриях печени до 24 и 19% соответственно, а в мозге—до 22%.

Далее в аналогичных условиях изучали роль пирувата в активировании НАДФ-ИДГ. Выявлена (табл. 2) сходная закономерность в отношении концентрации субстрата и динамики онтогенетических сдвигов. Различие в действии этих соединений состоит в том, что эффект пирувата в цитоплазме печени значительно превосходит таковой цитрата на ранних стадиях онтогенеза; на этих же стадиях развития он ускоряет окисление изоцитрата в митохондриях мозга интенсивнее, чем в митохондриях печени. У зрелых птиц это соединение в одинаковой степени (на 28%) стимулирует активность фермента в митохондриях мозга и обеих фракциях печени.

В следующей серии опытов нас интересовало действие оксалоацетата на активность НАДФ-ИДГ в тканях кур. Как видно из приведенных данных (табл. 3), это соединение отличается от испытанных нами ранее эффекторов тем, что его стимулирующий эффект увеличивается с повышением концентрации. Действие оксалоацетата также проявляется больше на ранних стадиях онтогенеза, что особенно выражено в печеночной ткани.

Влияние указанных соединений на активность НАДФ-ИДГ, полученной из других источников, описано в немногих работах. Так, влияние цитрата показано в отношении фермента, полученного из дрожжей [3] и цитоплазмы мозга крыс [5]; стимуляция пируватом отмечена в опытах на ферменте бактериального происхождения [9]; на изодривированных митохондриях печени крыс показано влияние оксалоацетата на окисление изоцитрата [4]. Полученные нами результаты показывают, что цитратный и пируватный контроль активности НАДФ-ИДГ в мозге и печени кур осуществляется низкими концентрациями этих соединений. Обращает на себя внимание факт сходного эффекта пирувата в митохондриях мозга и печени кур. Известно, что скорость включения C^{14} из меченого пирувата в цитрат в мозговой ткани крыс в несколько раз превосходит таковую в печени [2]. Одинаковая эффективность пирувата в отношении фермента из мозга и печени кур свидетельствует о том, что пируватный контроль активности НАДФ-ИДГ в тканях кур осуществляется не в результате вовлечения добавленного пирувата в цикл трикарбоновых кислот. Надо полагать, что обнаруженные единицы в скорости окисления изоцитрата в присутствии цитрата и пирувата происходят за счет изменения кинетики реакций. В молекуле НАДФ-ИДГ показано наличие, наряду с каталитическим, и других участков, связывание в которых различных соединений сопровождается изменением сродства фермента к субстрату, в частности, установлено, что модификация сульфгидрильных групп играет существенную роль в каталитическом процессе [11]. По-видимому, добавленные

Таблица 1

Влияние цитрата на активность НАДФ-НДГ в субцелочных фракциях печени и мозга кур в онтогенезе, мкмоль НАДФН/мг белка/мин

Возраст	Средние данные	Печень						Мозг					
		цитоплазма			митохондрии			цитоплазма			митохондрии		
		контроль	цитрат		контроль	цитрат		контроль	цитрат		контроль	цитрат	
			2.0 мМ	0.5 мМ		2.0 мМ	0.5 мМ		2.0 мМ	0.5 мМ		2.0 мМ	0.5 мМ
20-дневные эмбрионы (7)	M % активирования	0.110	0.127 15.5	0.157 43.0	0.172	0.209* 21.5	0.228* 33.0	0.035	0.049* 30.0	0.051* 34.0	0.062	0.072 12.0	0.077* 29.0
5-дневные цыплята (7)	M % активирования	0.130	0.170* 39.0	0.195* 51.0	0.093	0.103 17.0	0.117* 26.0	0.028	0.036 23.0	0.040* 43.0	0.028	0.036 29.0	0.039* 39.3
Куры (7)	M % активирования	0.025	0.061 11.0	0.068* 24.0	0.043	0.048 11.0	0.051* 19.0	0.009	0.010	0.011 22.2	0.018	0.020 11.1	0.02 22.2

* — P < 0.001.

Таблица 2

Влияние пирувата на активность НАДФ—НДГ в субклеточных фракциях печени и мозга кур в онтогенезе, якмоль НАДФН/мг белка/мин

Возраст	Средние данные	П е ч е н ь						М о з г					
		цитоплазма			митохондрии			цитоплазма			митохондрии		
		контроль	пируват		контроль	пируват		контроль	пируват		контроль	пируват	
			2.0 мМ	0.5 мМ		2.0 мМ	0.5 мМ		2.0 мМ	0.5 мМ		2.0 мМ	0.5 мМ
20-дневные эмбрионы (7)	М % активирования	0.110	0.178*	0.188*	0.172	0.181	0.201*	0.038	0.052	0.054*	0.062	0.075	0.083
			62.0	71.0			17.0		37.0	42.1		17.2	28.1
5-дневные выпята (7)	М % активирования	0.130	0.219*	0.240*	0.093	0.105	0.110	0.028	0.036	0.038*	0.028	0.036	0.040*
			68.4	85.0		13.0	18.3		29.0	36.0		29.0	43.0
Куры (7)	М % активирования	0.055	0.066*	0.070*	0.043	0.052*	0.055*	0.009	0.010	0.011	0.018	0.022	0.023*
			20.0	27.3		21.0	28.0			22.2		22.2	28.0

Таблица 3

Влияние оксалоацетата на активность НАДФН—НДГ в субклеточных фракциях печени и мозга кур в онтогенезе, мкмоль НАДФН/мг белка/мин

Возраст	Средние данные	Печень						Мозг					
		цитоплазма			митохондрии			цитоплазма			митохондрии		
		контроль	оксалоацетат		контроль	оксалоацетат		контроль	оксалоацетат		контроль	оксалоацетат	
			2.0 мМ	0.5 мМ		2.0 мМ	0.5 мМ		2.0 мМ	0.5 мМ		2.0 мМ	0.5 мМ
20-дневные эмбрионы (7)	М % активирования	0.110 103.0	0.223* 59.0	0.175* 59.0	0.172	0.236* 37.0	0.210* 22.1	0.038	0.052* 37.0	0.010 32.0	0.062	0.079 23.0	0.075 17.2
5-дневные цыплята (7)	М % активирования	0.130 69.0	0.218* 61.5	0.210* 61.5	0.093	0.110 18.3	0.104 12.0	0.028	0.041* 48.4	0.039* 39.3	0.028	0.039* 39.3	0.036 29.0
Куры (7)	М % активирования	0.055 25.0	0.069* 13.0	0.062* 13.0	0.043	0.053* 23.3	0.050 16.3	0.009	0.011 22.2	0.010	0.018	0.021 16.7	0.020 11.1

эфффекторы, связываясь в соответствующем участке молекулы фермента, вызывают такие конформационные изменения последнего, которые трансформируют каталитический центр в активное состояние. В больших количествах эти соединения могут конкурировать с изоцитратом за активный центр, как это показано в отношении цитрата, образующего комплекс с ионами и связывающегося в активном центре НАДФ-ИДГ аналогично изоцитрату [7]. Кроме того, поскольку НАДФ-ИДГ является димером, а лиганды способствуют образованию димера [6], в присутствии добавленных соединений могут происходить сдвиги в мономерно-димерном равновесии фермента.

Влияние оксалоацетата на активность НАДФ-ИДГ, качественно одинаковое с таковым цитрата и пировата, различается в отношении концентрации, вызывающей максимальную стимуляцию фермента. Это можно объяснить следующим образом. Известно, что оксалоацетат играет основную роль в регуляции активности цитратсинтазы, причем его содержание в тканях значительно ниже K_m для этого фермента [2]. Следовательно, накопление оксалоацетата в тканях может существенно влиять на скорость биосинтеза цитрата, что в свою очередь должно, по-видимому, опосредованно отражаться на активности НАДФ-ИДГ. Кроме того, показано наличие в молекуле НАДФ-ИДГ по крайней мере 2 типов центров для активаторов; доказана и пространственная обособленность различных аллостерических центров, в частности для бактериального фермента [6, 9]. По-видимому, неодинаковая зависимость скорости реакции от концентрации использованных активаторов обусловлена их связыванием в различных аллостерических центрах, отличающихся уровнем насыщения.

Интересно отметить, что НАДФ-ИДГ бактериального происхождения подавляется смесью оксалоацетата с глиоксилатом, что объясняют особенностями метаболизма изоцитрата у микроорганизмов и высших растений, где он занимает ключевое положение между двумя циклами: трикарбоновым и глиоксилатным [8, 10].

Из приведенного нами экспериментального материала видно, что в регуляции активности НАДФ-ИДГ в тканях кур определенную стимулирующую роль играют предшественники изоцитрата, действие которых, согласно литературным данным, может реализоваться через модификацию конформации фермента, приводящую к изменению его кинетических параметров. Особенностью полученных нами результатов является выявление большей чувствительности НАДФ-ИДГ из тканей кур к регуляторному влиянию всех использованных эффекторов в конце эмбриональной и начале постэмбриональной стадий развития. Известно, что НАДФ-ИДГ как олигомерный фермент имеет склонность к диссоциации и разбавленных растворах на малоактивные мономеры. Очевидно, на ранних стадиях онтогенеза в тканях кур он находится в более диссоциированном состоянии и добавленные активаторы способствуют быстрой ассоциации его мономеров с образованием реактивных форм фермента.

ԻԶՈՑԻՏՐԱՏԻ ՆԱԽՈՐԳՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՆԱԳՅ-ԿԱՆՎԱԾ
ԻԶՈՑԻՏՐԱՏԳԵՆԻԿՐՈԳԵՆԱԶԱՅԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ շՁԱՎԵՐԻ
ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ

Ռ. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Լ. Ա. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Ա. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է կիտրոնաթթվի, պիրոխաղաղաթթվի և օքսալաքաջախաթթվի ազդեցությունը նԱԿՑ-կախված իլոպիտրաադենիլդիֆոսֆատի ակտիվության վրա համեմատաբար լյարդի և ուղեղի միտոքոնդրիաներում ու բջջապլազմայում օնտոգենետիկ զարգացման ընթացքում: Ցույց է տրվել, որ ֆերմենտի ակտիվությունը նշված հյուսվածքներում խթանվում է կիտրոնաթթվի և պիրոխաղաղաթթվի ցածր, իսկ օքսալաքաջախաթթվի բարձր խառնուրդների դեպքում: Նշված ակտիվատորների ազդեցությունը հատկապես հանդես է գալիս սաղմնային զարգացման վերջում և հաստացմնային շրջանի սկզբում:

INFLUENCE OF ISOCITRATE PRECURSORS ON THE ACTIVITY
OF NADP-DEPENDENT ISOCITRATE DEHYDROGENASE
IN HENS TISSUES

R. A. SIMONIAN, L. A. HAROUTJUNIAN, A. A. SIMONIAN

The effect of citrate, pyruvate and oxaloacetate on the activity of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in hens brain and liver has been examined during ontogenesis. Low quantities of citrate and pyruvate and high concentrations of oxaloacetate increase the activity of the enzyme in the cytoplasm and mitochondria of both tissues. The influence of the precursors is more pronounced on the embryonic and early postembryonic stages of development.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Арутюнян Л. А., Симонян А. А., Мовсисян И. О. Онтогенез, 14, 213, 1983.
2. Ещенко Н. Д., Прохорова М. И. Вопросы биохимии мозга, 11, 78, Ереван, 1976.
3. Bernofsky S., Utter M. F. J. Biol. Chem., 241, 5461, 1966.
4. Chappell J. B. Biochem. J., 90, 225, 1964.
5. Grameck A., Rafalowska U. J. Neurochem., 19, 2687, 1972.
6. Illingworth J. A., Tipton K. F. Biochem. J., 118, 253, 1970.
7. Ingebretsen O. C. Biochem. Biophys. Acta, 452, 362, 1976.
8. Marr J. J., Weber M. M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 47, 1019, 1971.
9. Self C. H., Parker M. G., Weitzman P. Dp Biochem. J., 132, 215, 1973.
10. Shilo J., Ozaki H. J. Biochem., 64, 45, 1968.
11. Villafranca J. J., Cotman R. F. J. Biol. Chem., 247, 209, 1972.