

## УЧАСТИЕ ГЛУТАМАТА В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЛУТАМИНАЗЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ПОЧЕК КРЫС

Ж. Дж. СААКЯН, В. С. ОГАНЕСЯН

Институт биохимии АН Армянской ССР, лаборатория регуляции  
активности ферментов

Аннотация — Глутамат при pH 8,0 сильно ингибирует активность фосфат-зависимой глутаминазы, стимулируемую тиреоидными гормонами и другими эффекторами, добавленными в отдельности. При совместном применении гормонов с другими эффекторами тормозящее действие глутамата устранивается, а при сочетании фосфата с цитратом, сукцинатом, кетоглутаратом и аспаратом активность глутаминазы проявляется очень слабо. При высоких значениях pH глутамат усиливает стимулирующий эффект гормонов и, напротив, подавляет действие фосфата и других активаторов.

Անոտացիա — Գլուտամատին 8,0-ի pH-ի զեպրում խիստ արգելադրում է թիրեոիդ հորմոնների և նրանց անալոգների, առանկի ալելացված, կրողից խթանվող ֆոսֆատից կախում ունեցող գլուտամինազայի ակտիվությունը: Գլուտամինազի արգելակիչ հատկությունը վերանում է թիրեոիդ հորմոնների և վերոհիշյալ միացությունների համատեղ կիրառման զեպրում, իսկ ֆոսֆատը ցիտրատի, սուկցինատի, կետոգլուտարատի և ասպարտատի հետ համատեղ կիրառելիս գլուտամինազայի ակտիվությունը գլուտամատի արգելեցութիւմը շատ թույլ է զրսևորվում: pH-ի բարձր արժեքների զեպրում գլուտամինազի ակտիվությունը ուժեղացնում է հորմոնների խթանիչ էֆեկտը, իսկ ֆոսֆատի և մնացած էֆեկտորների խթանիչ արգելեցությունը շարունակում է արգելակվել:

**Abstract** — In case of pH 8,0 the glutamate strongly inhibits the phosphate-dependent glutaminase activity, which is stimulated by thyroid hormones and their analogues, added separately. The joint addition of these substances with thyroid hormones is accompanied by a reduction of the inhibitory effect of glutamate, meanwhile in case of joint addition of phosphate with citrate, succinate, ketoglutarate, aspartate the glutaminase activity is still inhibited by glutamate. At high pH values effect of glutamate enhances the stimulatory effect of hormones and, on the other hand, inhibits the activating effect of phosphate and others.

*Ключевые слова:* глутаминаза, тиреоидные гормоны, почки.

Деамидирование глутаминна как в почках, так и в других органах животных осуществляется главным образом фосфатзависимой глутаминазой (ФЗГ), которая в отсутствие активаторов обладает низкой каталитической активностью. Метаболиты цикла трикарбоновых кислот, макроэрги, коферменты, гормоны и другие соединения физиологической природы являются сильными стимуляторами ее активности [7, 8, 13, 14, 16, 17]. Регуляция активности глутаминазы мозга, почек, печени и селезенки носит сложный характер и зависит от множества факторов. Необходимо указать, что особое место в этом процессе занимают тиреоидные гормоны (ТГ), действие которых на активность фермента по ряду параметров отличается от действия других активаторов [2, 3, 5, 6, 9,

10]. Наряду с этим, важное значение в функциональной деятельности глутаминазы мозга, почек и селезенки имеет конечный продукт глутаминовой реакции—сильный ингибитор этого фермента— глутаминовая кислота (ГК). Действие ГК на активность глутаминазы мозга изучено детально [1, 4, 6]. Выявлен ряд примечательных закономерностей, зависящих от эффекта ТГ. Вместе с этим показано, что действие ГК на активность глутаминазы селезенки имеет свои отличительные особенности [2]. Хотя и известно, что ГК является сильным ингибитором глутаминазы почек, однако ее роль в регуляции активности этого фермента с участием ТГ и других активаторов не изучена. Выяснению этого вопроса посвящается настоящее исследование.

*Материал и методика.* В качестве источника глутаминазы использовали митохондриальную фракцию, полученную из коры почек белых крыс массой 150—200 г, по ранее описанной методике [10]. Выделенную митохондриальную фракцию промывали один раз, затем готовили взвесь на 0,2 М трис-НСI буфере с таким расчетом, чтобы количество этой фракции в 0,5 мл соответствовало примерно 2 мг белка; рН трис-НСI буфера варьировал от 8,0 до 9,5. Митохондриальную взвесь выдерживали в течение часа при комнатной температуре, после чего добавляли к пробам. Инкубационная смесь содержала 0,5 мл митохондриальной взвеси, 20 мМ L-глутамин и, в зависимости от поставленной задачи, различные концентрации следующих активаторов: тиреоидные соединения (ТС)—L-тироксин ( $T_4$ ), 3,3',5-трийодо-L-тиронин ( $T_3$ ), 3,5-дйодо-L-тиронин ( $T_2$ ), 3,3',5-трийодо-тиреоксусная кислота ( $T_3УК$ ), 3,3',5-трийодо-тиреопропионовая кислота ( $T_3ПК$ )—все препараты фирмы Sigma, США; фосфат ( $\Phi_p$ ), цитрат (ЦТ), сукцинат (СТ), кетоглутарат (КГ) и аспартат (АК) добавляли в количестве 50 мМ. Объем реакционной смеси доводили водой до 1,5 мл и инкубировали при 37° в течение 15 мин при постоянном встряхивании. Реакцию останавливали добавлением к каждой пробе по 0,3 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты и центрифугировали. О глутаминовой активности судили по количеству образовавшегося аммиака, который определяли микродиффузионным методом [11]. Содержание белка определяли по методу Лоурри [15].

*Результаты и обсуждение.* Ранее нами было показано, что при низких значениях рН активность глутаминазы мозга, стимулируемая различными эффекторами, под действием ГК сильно подавляется. Однако с повышенным рН среды в зависимости от применяемого активатора ГК оказывает разнонаправленное действие. Оказалось, что в присутствии ГК стимулирующий эффект  $\Phi_p$ , ЦТ, СТ, КГ и АК подавляется при любых значениях рН. В то же время при высоких значениях рН в присутствии ГК активирующее влияние ТГ усиливается в несколько раз [4, 6]. Наряду с этим было установлено, что на активность глутаминазы митохондриальной фракции селезенки ГК оказывает однонаправленное действие. При низких значениях рН независимо от применяемого активатора ГК одинаково сильно подавляет активность фермента, а при высоких как в случае применения ТГ, так и  $\Phi_p$  ее тормозящее действие полностью исчезает [2].

Исследования, проведенные с глутаминой митохондриальной фракции почек, показали, что характер действия ГК в этом случае зависит от рН среды (табл. 1). При рН 8,0 активирующее влияние всех ТС под действием 20 мМ ГК полностью подавляется, с повышением его до 8,5 ингибирование активности фермента заметно уменьшается. При рН 9,0 в опытах с применением  $T_3, T_3УК$  и  $T_3ПК$  тормозящее дей-

Таблица 1. Действие глутамата (20 мМ) на активность глутаминазы (мкмоль пимиака/мг белка) митохондриальной фракции почек в присутствии ТГ (0,1 мМ) и их пивалатов в зависимости от рН среды.

рН	Добавки, мМ	L-Тироксин	Трийодо-L-тиронин	Трийодотиреоуксусная кислота	Трийодогиреопропионовая кислота
8.0	Контроль	0.94±0.08 (7)	0.73±0.07 (6)	0.58±0.05 (7)	1.17±0.14 (6)
	Глутамат	0 (2)	0 (2)	0 (2)	0 (2)
8.5	Контроль	1.8±0.14 (13)	1.4±0.12 (11)	1.05±0.08 (10)	2.0±0.31 (5)
	Глутамат	0.73±0.17 (9)	0.29±0.04 (9)	0.6±0.05 (9)	0.8±0.1 (5)
9.0	Контроль	1.47±0.07 (10)	2.95±0.15 (12)	1.05±0.08 (10)	1.3±0.13 (5)
	Глутамат	3.35±0.25 (10)	2.0±0.19 (11)	1.17±0.12 (10)	1.5±0.2 (5)
9.5	Контроль	0.94±0.04 (11)	1.7±0.1 (10)	1.02±0.09 (11)	1.3±0.15 (5)
	Глутамат	4.05±0.4 (11)	4.79±0.48 (9)	3.6±0.25 (10)	4.7±0.52 (5)

В скобках здесь и далее приведено количество опытов.

стве ГК исчезает, а эффект Т<sub>1</sub> при этом усиливается в два раза. Интересно, что при дальнейшем повышении рН до 9,5 ГК усиливает стимулирующее действие всех ТС в несколько раз. Однако в исследованиях, проведенных с другими активаторами почечной глутаминазы, наблюдалась иная закономерность (табл. 2). Под влиянием 20 мМ ГК стимулирующее действие Ф<sub>1</sub>, ЦТ, СТ и КГ на активность глутаминазы подавляется при всех значениях рН. Вместе с тем в эффекте этих ак-

Таблица 2. Действие глутамата (20 мМ) на активность глутаминазы (мкмоль пимиака/мг белка) митохондриальной фракции почек в присутствии различных эффекторов в зависимости от рН среды.

рН	Добавки, мМ	Фосфат 10	Цитрат 50	α-Кетоглутарат 50	Сукцинат 50
8.0	Контроль	2.4±0.2 (10)	1.8±0.2 (6)	1.05±0.08 (5)	1.2±0.09 (5)
	Глутамат	0.15±0.04 (5)	0.14±0.03 (6)	0.08±0.009 (5)	0.13±0.03 (5)
8.5	Контроль	4.1±0.37 (4)	3.23±0.25 (5)	1.5±0.09 (5)	2.1±0.25 (5)
	Глутамат	0.52±0.07 (4)	0.35±0.05 (5)	0.15±0.05 (5)	0.16±0.03 (5)
9.0	Контроль	4.58±0.26 (4)	4.3±0.38 (5)	2.97±0.27 (4)	2.79±0.28 (4)
	Глутамат	0.97±0.08 (4)	0.94±0.08 (4)	0.28±0.06 (5)	0.23±0.06 (4)
9.5	Контроль	4.2±0.47 (6)	4.6±0.44 (6)	3.58±0.25 (4)	3.55±0.27 (4)
	Глутамат	1.4±0.18 (6)	1.61±0.22 (6)	0.38±0.06 (4)	0.47±0.07 (5)

тиваторов обнаруживаются некоторые отличия. В случае применения  $\Phi_{II}$  и ТГ при высоких значениях рН подавление активности фермента, вызванное ГК, уменьшается, а с СТ и КГ не меняется. Из результатов этих исследований следует, что в отличие от глутаминазы селезенки глутаминаза почек по своим регуляторным свойствам идентична с мозговым ферментом.

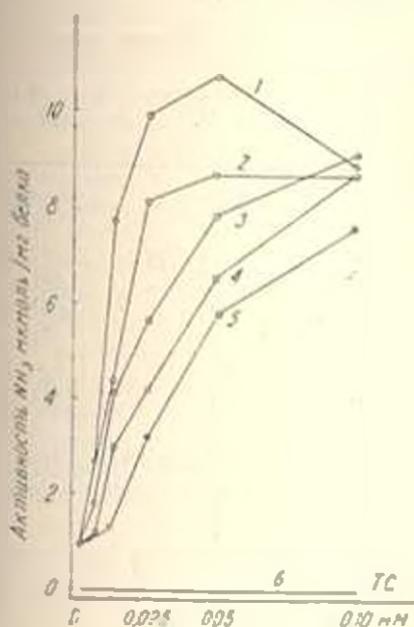
Итак, на основании полученных данных можно прийти к выводу, что в зависимости от рН среды чувствительность глутаминазы почек к действию ГК претерпевает как количественные, так и качественные изменения. Примечательно, что в присутствии ТС действие ГК на глутаминазу принципиально меняется. При этом ГК не только не тормозит, а значительно усиливает активирующее влияние гормонов. Это дает нам право думать, что гормоны, в отличие от других активаторов, имеют стереоспецифические регуляторные центры на поверхности молекулы фермента. Кроме того, из приведенных данных явствует, что тормозящее действие ГК не обусловлено прямым перекрыванием каталитических и регуляторных центров глутаминазы, а опосредовано изменением конформации ее молекулы и что ГК является аллостерическим ингибитором для глутаминазы почек. Очевидно, механизм, лежащий в основе потенцирования эффекта ТГ в присутствии ГК, носит сложный характер, и в настоящее время трудно дать полное объяснение этому феномену. Можно думать, что только при наличии гормона повышение рН среды приводит к такой конформационной перестройке молекулы глутаминазы, при которой под действием ГК наступает повторное, в то же время принципиально отличное изменение конформации фермента, благодаря которому повышается, а не подавляется ее активность. Для окончательного выяснения этих механизмов необходимы дальнейшие исследования.

В связи с тем, что ГК в достаточном количестве содержится в тканях организма и образуется в процессе глутаминовой реакции, возникает вопрос: может ли функционировать глутаминаза при физиологических значениях рН, если ГК сильно подавляет ее активность?

Учитывая это обстоятельство и то, что ГК в достаточно большом количестве содержится в мозговой ткани, некоторые авторы приходят к заключению, что глутаминаза мозга может функционировать только в тех случаях, когда содержание ГК в этом органе значительно снижается по сравнению с нормой и фермент освобождается от ее ингибирующего влияния [12]. Однако ранее проведенные исследования показали, что при одновременном применении Тс с  $\Phi_{II}$  ингибирующее влияние ГК на глутаминазу мозга устраняется [1].

Учитывая вышесказанное, в следующей серии опытов мы изучали действие ГК на активность глутаминазы митохондриальной фракции почек при сочетании применении ТГ с  $\Phi_{II}$  и другими эффекторами. Данные, представленные на рис., показывают, что при рН 8,0 в присутствии 20 мМ ГК и такого же количества  $\Phi_{II}$  имеет место лишь слабое активирование глутаминазы почек, а в случае применения ТГ совместно с ГК ее активность полностью подавляется. Однако сочетание ГК + ТГ +  $\Phi_{II}$  приводит к сильному потенцированию их стимулирующего дей-

ствия, и активность глутаминазы многократно повышается. Из приведенных данных видно, что в зависимости от природы ТС и их концентрации потенцирование проявляется в различной степени. Так, при концентрации  $T_3$ ПК и  $T_3$ УК 0,006 мМ уже наблюдается двукратное по-



Действие ГК на активность глутаминазы митохондриальной фракции почек при совместном применении ТС и  $\Phi_n$  (20 мМ), рН 8,0.  
 1.  $T_3$ ПК +  $\Phi_n$ . 2.  $T_3$ УК +  $\Phi_n$ . 3.  $T_4$  +  $\Phi_n$ . 4.  $T_2$  +  $\Phi_n$ . 5.  $T_1$  +  $\Phi_n$ . 6.  $T_1$ .

вышение активности фермента, а наиболее эффективное повышение его происходит в присутствии 0,05 мМ  $T_3$ ПК.  $T_4$  и  $T_3$ , и в особенности  $T_2$ , при сравнительно низких концентрациях потенцируют слабо, между тем как при концентрации 0,1 мМ  $T_4$  и  $T_2$  также эффективны, как и  $T_3$ ПК, добавленная в той же концентрации. Таким образом, из результатов проведенных исследований выяснилось, что при одновременном применении ТС с  $\Phi_n$  тормозящее действие ГК на активность глутаминазы почек устраняется.

Далее мы изучали влияние ГК на активность глутаминазы почек при совместном применении ТГ с другими модуляторами этого фермента. Как показывают данные, приведенные в табл. 3, стимулирующее действие ЦТ, СТ, КГ, АК и ТГ, добавленных в отдельности, в присутствии 10 мМ ГК сильно подавляется. Однако, несмотря на наличие ГК, совместное применение указанных модуляторов с ТГ приводит к усилению эффекта потенцирования и значительному повышению активности фермента. Наиболее эффективное потенцирование активности глутаминазы в этих опытах наблюдается в случае применения  $T_4$  с СТ и КГ, а наименее — при одновременном применении этих же соединений с  $T_3$ УК.

Сравнивая результаты этих опытов с данными, представленными на рис., можно заметить, что в присутствии  $\Phi_n$   $T_3$ УК больше  $T_4$ ,  $T_3$  и  $T_2$  повышает активность фермента, а при применении СТ и КГ, напротив,  $T_3$ УК слабее всех стимулирует глутаминазную активность.

Из этих опытов выяснилось, что ингибирующее действие ГК на глутаминазу почек устраняется не только в случае сочетания ТГ с  $\Phi_n$ ,

Таблица 3. Действие глутамата (10 мМ) на активность глутаминазы (мкмоль аммиака/мг белка) митохондриальной фракции почек при совместном применении ГГ (0,1 мМ) и их производных с различными эффекторами (50 мМ).

Добавки, 0,1 мМ	Глутамат				
		Цитрат	Сукцинат	$\alpha$ -Кетоглутарат	Аспарат
	Контроль	0.43±0.06 (9)	0.61±0.05 (10)	0.56±0.05 (8)	0.14±0.02 (10)
L-Тироксин	0.11±0.02 (5)	2.32±0.2 (5)	6.02±0.42 (5)	5.5±0.4 (5)	2.97±0.34 (5)
Трийодо-L-тиронин	0.17±0.03 (5)	3.17±0.32 (5)	3.82±0.4 (4)	3.4±0.37 (5)	1.4±0.16 (4)
Трийодотиреоук- сусная кислота	0.26±0.03 (5)	1.64±0.2 (4)	2.05±0.24 (5)	2.23±0.17 (5)	2.55±0.28 (5)
Дийодо-L-тиронин	0.05±0.008 (5)	2.67±0.33 (5)	3.02±0.25 (4)	3.76±0.34 (5)	1.7±0.1 (5)

но и при их совместном применении с другими модуляторами фермента, и степень устранения тормозящего эффекта ГК зависит не только от природы ТС, но и от характера сочетаемого модулятора.

Результаты следующей серии опытов показали (табл. 4), что в присутствии ГК при сочетании с  $\Phi_{II}$  с другими модуляторами не происхо-

Таблица 4. Действие глутамата на активность глутаминазы (мкмоль аммиака/мг белка) митохондриальной фракции почек при совместном применении фосфата (10 мМ) с другими эффекторами (50 мМ).

Добавки, мМ		Цитрат	Сукцинат	$\alpha$ -Кетоглу- тарат	Аспарат
Глутамат 10	0	0.43±0.06 (9)	0.61±0.05 (10)	0.56±0.05 (8)	0.14±0.02 (10)
Глутамат 20	0	0.12±0.03 (6)	0.23±0.06 (6)	0.15±0.05 (4)	0.06±0.008 (6)
Фосфат+Глутамат 10	0.42±0.03 (6)	1.22±0.09 (6)	1.6±0.25 (6)	1.25±0.26 (4)	0.8±0.12 (6)
Фосфат+Глутамат 20	0.18±0.02 (6)	0.33±0.05 (6)	0.8±0.11 (6)	0.5±0.12 (4)	0.41±0.02 (6)

дит заметного повышения активности фермента. Следует отметить, что действие  $\Phi_{II}$  в сочетании с ЦТ, СТ, КГ и АК на активность глутаминазы мозга приводит к потенцированию их эффекта, между тем как в случае с глутаминазой почек наблюдается либо суммация, либо только эффект  $\Phi_{II}$  [9]. Вместе с тем было показано, что при одновременном применении  $\Phi_{II}$  с этими модуляторами ингибирующее действие ГК на активность глутаминазы мозга частично устраняется.

Итак, можно прийти к заключению, что для устранения ингибирующего влияния ГК на активность почечной глутаминазы необходимо сочетание двух различных модуляторов при условии, что один из них должен быть представлен гормоном щитовидной железы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бадалян А. Л., Буняты Г. Х., Оганесян В. С., Вопросы биохимии мозга, 10, 40. Ереван, 1975.
2. Оганесян В. С., Айрапетян Р. Л., Биолог. ж. Армении, 35, 1, 1983.
3. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г., Биолог. ж. Армении, 32, 5, 477, 1979.
4. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г., Беджанян К. Д., Нейрохимия, 3, 4, 372, 1984.
5. Оганесян В. С., Буняты Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян А. Л., Вопросы биохимии мозга, 6, 1, Ереван, 1970.
6. Оганесян В. С., Бадалян А. Л., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж., Вопросы биохимии мозга, 8, 77, Ереван, 1973.
7. Оганесян В. С., Докл. АН АрмССР, 48, 171, 1969.
8. Оганесян В. С., Микиртумова К. С., Буняты Г. Х., Вопросы биохимии мозга, 12, 5, Ереван, 1977.
9. Оганесян В. С., Саакян Ж. Дж., Биолог. ж. Армении, 35, 4, 264, 1982.
10. Оганесян В. С., Саакян Ж. Дж., Айрапетян Р. Л., Биолог. ж. Армении, 33, 932, 1980.
11. Силакова А. Н., Труш Г. И., Являкова А., Вопросы мед. химии, 8, 538, 1962.
12. Katunuma N., Huzino A., Tomino J., Advances in Enzyme Regulation, 5, 55, 1967.
13. Keating E., Torgner I. Aa. FEBS LETTERS, 47, 244, 1974.
14. Keating E., Torgner I. Aa. Biochem. J., 149, 83, 1975.
15. Lowry O., Rosebrough O., Farr N., Randall R. G. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
16. Weil-Malherbe H. J. Neurochem., 19, 2257, 1972.
17. Weil-Malherbe H., Beull G. D. J. Neurochem., 17, 1101, 1970.

Поступило 16.V 1986 г.

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 1, с. 55—58, 1987

УДК 616.995.132

### АНТЕЛМИНТИННАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТИАБЕНДАЗОЛА, ТИАБЕНДАЗОЛА В СОЧЕТАНИИ С ПРЕДНИЗОЛОНОМ И ДРОНЦИТА ПРИ МЫШЕЧНОЙ ФАЗЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТРИХИНЕЛЛЕЗА КРОЛИКОВ

М. С. МОВСЕСЯН, К. В. ШАХБАЗЯН, А. М. АСАТРЯН

Институт зоологии АН Армянской ССР, лаборатория гельминтологии, Ереван

Аннотация — Изучена антгельминтная эффективность тиабендазола, тиабендазола в сочетании с преднизолоном и дронцита при мышечной фазе экспериментального трихинеллеза кроликов. Установлена высокая эффективность тиабендазола (25 мг/кг) в сочетании с преднизолоном (15 мг/кг) при пероральном введении в течение 5 дней.

Անտեմինտինային — Ինտենսիվորժամ 1 տիարենդազոլի, տիարենդազոլը համակցված պրեդնիզոլոնի հետ և դրոնցիտի հակառեպրեսիային աղդեցումներ ճագարների տրիխինելլեզի մկանային փուլի ղեկորում: Ապացուցված է տիարենդազոլի (25 մգ/կգ) և պրեդնիզոլոնի (15 մգ/կգ) համառեզ օգտագործման արդյունավետությունը 5 օրյա կերակրման ղեկորում:

**Abstract** — The anthelmintic efficiency of tiabendazol, tiabendazol in combination with prednizolon and droncite in the muscular stage of experimental trichinosis in rabbits has been studied. The high efficiency of tiabendazol (25 mg/kg) in combination with prednizolon (15 mg/kg) during the peroral introduction in the period of 5 days has been established.