



Биолог. журн. Армении, 3 (65), 2013

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА АМИДНЫЕ ГРУППЫ БЕЛКОВ ПЕЧЕНИ КРЫС

А.С. ДИЛБАРЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра биохимии
alladil1777@mail.ru

Исследовалась амидированность белков печени крыс, подверженных гипоксии, и изменение содержания амидных групп белков при инкубировании гомогенатов печени. Показано, что в условиях гипоксии происходит амидирование белков печени, присущее процессам торможения. В течение 3-часовой инкубации наблюдается дезамидирование в суммарной, легко- и трудногидролизуемых фракциях амидных групп белков печени, что позволяет предположить, что амидные группы белков печени крыс, подверженных гипоксии, причастны к аммиакообразованию, наблюдаемому при инкубации гомогенатов печени.

Гипоксия – амидные группы белков – инкубирование гомогенатов – аммиакообразование

Հետազոտվել է հիպոքսիայի ենթարկված առնետների լյարդի սպիտակուցների ամիդացումը, ինչպես նաև սպիտակուցների ամիդային խմբերի պարունակության փոփոխությունը լյարդի հոմոգենատները ինկուբացնելիս: Ցույց է տրված, որ հիպոքսիայի պայմաններում տեղի է ունենում լյարդի սպիտակուցների ամիդացում, արգելակման պրոցեսներին բնորոշ: Երեք ժամյա ինկուբացիայի ընթացքում դիտվում է գումարային դեզամիդացում, հեշտ և դժվար հիդրոլիզվող ամիդային խմբերի ֆրակցիաներում, ինչը թույլ է տալիս ենթադրել, որ հիպոքսիայի ենթարկված առնետների լյարդի սպիտակուցների ամիդային խմբերը մասնակցում են ամոնիակառաջացմանը, որը դիտվում է լյարդի հոմոգենատները ինկուբացնելիս:

Հիպոքսիա – սպիտակուցների ամիդային խմբեր – հոմոգենատների ինկուբացիա – ամոնիակառաջացում

Amidation of rat liver proteins, as well as changes in the content of amide groups during incubation of liver homogenates have been studied. It is shown, that under hypoxia take place amidation of liver proteins, which is also typical for inhibition processes. The amidation of liver proteins takes place under the hypoxia, the desamidation in fractions of total, easy and hard hydrolysable amide groups of rat liver proteins was observed during 3 hour incubation. They take part in ammonia formation processes, which observed during incubation of liver homogenates.

Hypoxia – protein amide groups – incubation of homogenates – ammonia formation

Амидным группам белков тканей придается определенное значение в механизмах аммиакообразования и нейтрализации аммиака. Предполагалось участие белковых амидных групп и в процессе интенсивного аммиакообразования, происходящего при инкубации гомогенатов тканей. Однако в результате детального изучения этого вопроса была исключена ранее допускаемая возможность дезамидирования белков, поскольку суммарное содержание амидных групп белков, тщательно промытых липорастворителями ТХУ-осадков гомогенатов мозга и печени, при инкубации гомогенатов не изменялось [1, 2]. Было показано, что при инкубации гомогенатов

печени в присутствии L-аминокислот наблюдаемый прирост аммиака также не сопровождается дезамидированием белков [3].

Имеются многочисленные данные об изменении амидированности белков, особенно мозга, при различных функциональных и экстремальных состояниях организма. Доказано, что при процессах возбуждения, вызванных электрическим раздражением [7], гипероксией [5, 9], при введении инсулина [13], камфоры [7], наряду с интенсивным расходом энергетических субстратов, происходит дезамидирование белков тканей. И наоборот, при протекании тормозных процессов, в частности во время естественного сна, зимней спячки [4], при мединаловом [13] и нембуталовом наркозе [6], происходит амидирование белков тканей. Показано также увеличение амидированности белков тканей при действии вибрации на организм [12].

Целью настоящей работы является исследование амидированности белков печени крыс при гипоксии и динамики амидных групп при инкубировании гомогенатов печени крыс, подвергнутых гипоксии.

Материал и методика. Объектом исследования служили белые крысы массой 150-200 г. Подопытные животные были разделены на 2 группы: 1 – интактные; 2 – подвергались гипоксии в барокамере, где создавалось давление 335 мм рт.ст., соответствующее высоте 6 км над уровнем моря. Животных обеих групп подвергали декапитации, извлекали мозг и гомогенизировали в гомогенизаторе типа Поттер-Эльведжема в 0.05 М K^+ -фосфатном буфере, pH 7,4. До и после 3-часовой инкубации гомогенатов определяли в предварительно очищенных от азотсодержащих соединений и липидов ТХУ-осадках гомогената печени белковый амидоазот. Очистку проводили следующим образом: ТХУ-осадок трижды промывали 5%-ной ТХУ по 15 мин, последнюю проводили на водяной бане при 90°C в течение 30 мин; осадок обрабатывали последовательно органическими растворителями: смесью этанола с хлороформом (2:1) 5 мл, 15 мин; этанолом 5 мл, 15 мин; смесью этанола с эфиром (2:1) 5 мл, 15 мин (обрабатывали дважды, вторую обработку проводили при 70°C); трижды эфиром 5 мл, 10 мин.

Амидные группы белков определяли по количеству аммиака, выделившегося при гидролизе очищенного осадка в 1N H_2SO_4 при 100°C. При определении суммы амидных групп (САГ) осадки подвергали гидролизу в течение 180 мин, при определении легкогидролизуемых амидных групп (ЛАГ), принадлежащих аспарагину, – 30 мин. Трудногидролизуемые амидные группы (ТАГ), принадлежащие глутамину, определяли по разности САГ и ЛАГ [8]. Содержание аммиака в предварительно нейтрализованном гидролизате определяли микродиффузионным методом Зелингсона в модификации Силаковой [11]. Статистическую обработку полученных данных проводили методом Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Данные, полученные при исследовании амидированности белков печени интактных и подверженных гипоксии крыс, приведены в табл. 1 и 2.

Согласно полученным данным (табл. 1), при 3-часовой инкубации гомогенатов САГ белков печени в интактной группе животных не меняется и составляет 29,88 мкМ/г и 29,75 мкМ/г до и после инкубации соответственно, что подтверждает ранее сделанное заключение о непричастности амидных групп белков печени к аммиакообразованию, происходящему при инкубации гомогенатов [2].

В течение инкубации наблюдается некоторое перераспределение амидного азота между ЛАГ (17,37 мкМ/г до –14,9 мкМ/г после инкубации) и ТАГ (12,51 мкМ/г до и 14,85 мкМ/г после инкубации), в результате которого в легкогидролизуемой фракции происходит уменьшение амидоазота на 2,47 мкМ/г после инкубации гомогената, а в трудногидролизуемой, наоборот, увеличение последнего на 2,34 мкМ/г. Следует подчеркнуть, что и ряд других авторов указывал на перераспределение между фракциями и амидных групп белков при различных функциональных состояниях в результате трансконформационных изменений последних [10].

Результаты исследований амидированности белков печени крыс, подвергнутых гипоксии, приведены в табл. 2.

Табл. 1. Содержание амидного азота белков печени крыс до и после трехчасовой инкубации гомогенатов, мкМ/г свежей ткани, n=8, p<0,001.

Условия опыта	САГ	ЛАГ	ТАГ
До инкубации	29,88±1,37	17,37±1,30	12,51±0,67
После инкубации	29,75±1,62	14,90±1,35	14,85±0,73
Разница	0,13	2,47	2,34

Табл. 2. Содержание амидного азота белков печени крыс, подверженных гипоксии, до и после трехчасовой инкубации гомогенатов, мкМ/г свежей ткани, n=8, p<0,001

Условия опыта	САГ	ЛАГ	ТАГ
До инкубации	35,50±0,52	22,70±1,06	12,80±1,26
После инкубации	29,85±1,11	19,13±0,69	10,72±1,51
Разница	5,65	3,57	2,08

Как видно из полученных данных, под воздействием гипоксии САГ белков печени увеличивается и составляет 35,50 мкМ/г, что превосходит суммарное содержание амидных групп у интактных животных на 5,62 мкМ/г. Очевидно, под воздействием гипоксии происходит амидирование белков печени, что имеет место при развитии тормозных процессов.

При инкубации гомогенатов печени крыс, подверженных гипоксии, наблюдается иная картина, нежели у интактных животных. В экспериментах с гипоксией в течение трехчасовой инкубации происходит уменьшение САГ белков печени с 35,50 мкМ/г до 29,85 мкМ/г, что свидетельствует о дезамидировании амидных групп белков печени на 5,65 мкМ/г амидоазота.

Содержание ЛАГ в белках печени крыс под действием гипоксии, также как и САГ, увеличивается по сравнению с интактными животными и составляет 22,7 мкМ/г, т.е. происходит амидирование белков этой фракции на 5,33 мкМ/г. Во время инкубации гомогената наблюдается обратный процесс – дезамидирование белков печени на 3,57 мкМ/г амидозота. Количество же ТАГ под действием гипоксии увеличивается всего на 0,29 мкМ/г, однако в течение инкубации гомогенатов печени наблюдается дезамидирование этой фракции на 2,08 мкМ/г амидоазота.

На основании приведенных данных можем заключить, что амидирование белков печени крыс в условиях гипоксии происходит за счет легкогидролизуемой фракции, принадлежащей аспарагину. Амидированные при гипоксии белки печени крыс, в отличие от белков интактных животных, принимают участие в аммиакообразовании, происходящем в течение 3-часовой инкубации гомогенатов печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бадалян И.А., Давтян М.А. Амидные группы белков и аммиакообразование в головном мозгу крыс. *Нейрохимия*. 5, 4, с. 384-390, 1986.
2. Бадалян И.А., Давтян М.А. Амидные группы белков и процесс аммиакообразования в печени крыс. *Биолог. журн. Армении*, 34, 11, с. 986-987, 1986.
3. Бадалян И.А., Григорян А.Л. Влияние аминокислот на амидные группы белков печени. *Ученые записки ЕГУ*, 3, с. 151-153, 2005.
4. Владимирова Е.А. Аммиак головного мозга как специфический биохимический показатель функционального состояния центральной нервной системы. – В кн. "Биохимия нервной системы", Киев, изд-во АН Укр. ССР, с. 47-62, 1954.

5. Гершеневич З.С., Кричевская А.А. Амидные и карбоксильные группы белков печени при кислородной интоксикации. Биохимия, 25, 2, с. 310-317, 1960.
6. Кометиани П.А. О метаболической активности амидного азота белков головного мозга. Биохимия, 35, 2, с. 394-403, 1970.
7. Кометиани П.А., Клейн Е.Э., Иорданишвили Г.С., Гвалия Н.В., Чикваидзе В.Н. Пути образования и устранения аммиака в головном мозгу. В кн. „Вопросы биохимии нервной мышечной систем“. Тбилиси, изд-во Мецниереба, с. 41-63, 1965.
8. Кричевская А.А., Лукаш А.И., Пушкина Н.В., Херувимова В.А. Амидированность белков печени позвоночных и возможные причины разной прочности амидной связи. Ж. эволюц. биохим. и физиол., 2, с. 206-208, 1973.
9. Новикова Е. И. Действие гипероксии на белки сыворотки крови и печени крысы. Ростовский ун-т, Ростов-на-Дону, Деп. в Винити 12 августа 1980, 3555-80, 1980.
10. Папаян А.А. Амидные группы белков мозга при умирании и оживлении организма. Журн. exper. и клинич. медицины. 14, 5, с. 28-32, 1974.
11. Силакова А.И., Труш Г.П., Являкова А. Микрометод определения аммиака и глутамина в тканевых трихлоруксусных экстрактах. Вопросы мед. химии, 8, 5, с. 538-544, 1962.
12. Симонян Л.П., Папаян К.М., Бадалян И.А. Влияние вибрации на аммиакообразование в мозгу крыс. Материалы республиканской молодежной научной конференции. Экологическая наука в Армении, с. 146-153, 2001.
13. Тяхебылд Л.Я. Деаидирование белков печени и изменение их макроструктуры под влиянием инсулина. ДАН СССР, 147, 4, с. 964-966, 1962.

Поступила 26.03.2013