



Биолог. журн. Армении, 2 (71), 2019

ПУТИ ОБМЕНА АМИДОВ В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ

Н.Х. ХАЧАТРЯН

Институт биохимии им. Г. Бунятына НАН РА
narine-khachatryan-1982@mail.ru

Показано, что митохондриальная фракция поджелудочной железы содержит активную фосфатактивируемую глутаминазу, которая активируется также АТФ и кетоглутаратом. При инкубации гомогенатов поджелудочной железы с аспарагином в присутствии АТФ или кетоглутарата отмечается достоверное повышение уровня глутамин.

Аспарагин – глутамин – митохондрии – поджелудочная железа

Ցույց է տրված, որ ենթաստամոքսի զեղծի միտոքոնդրիալ ֆրակցիան պարունակում է ակտիվ ֆոսֆատակտիվացնող գլյուտամինազ, որը ակտիվանում է ոչ միայն ԱԵՖ-ով, այլ նաև α -կետոգլյուտարատով: Ենթաստամոքսի զեղծի հոմոգենատի ինկուբացիան ասպարագինի հետ ԱԵՖ-ի և α -կետոգլյուտարատի առկայությամբ հավաստիորեն բարձրացնում է գլյուտամինի կոնցենտրացիան:

Ասպարագին–գլյուտամին–միտոքոնդրիում–ենթաստամոքսայինզեղծ

It was shown that the mitochondrial fraction of pancreas contained phosphate activated glutaminase, activating also by ATP and ketoglutarate. Homogenates of pancreas catalised glutamine formation from asparagine in present of ATP or ketoglutarate.

Asparagines –glutamine –mitochondria –pancreas

В ряде исследований показана аналогия обмена нейроактивных аминокислот в препаратах мозга и островковых клеток поджелудочной железы [7,12-15]. Выявлены высокие значения концентрации ГАМК, глутамин и дикарбоновых аминокислот в поджелудочной железе, особенно в β -клетках островков Лангерганса [9,10], которые, как и клетки мозга и иммунной системы, содержат рецепторы аминокислотных нейротрансмиттеров [6]. Подобное сходство в строении определяет и функциональное сходство, которое заключается в стимуляции нейроактивными аминокислотами таких функций β -клеток, как синтез и секреция инсулина, сопровождаемые подавлением функций других островковых клеток, в особенности в подавлении синтеза и секреции глюкагона. В свою очередь глюкагоноподобный пептид-I стимулирует синтез ГАМК панкреатическими β -клетками на уровне

глутаматдекарбоксилазы [15]. Известно, что как и в мозге основным источником нейроактивных аминокислот в панкреасе, вернее в ее β -клетках, является фосфатактивируемая глутаминаза (ФАГ), подавляемая глутаматом, но не аммиаком [8,13]. Вместе с тем мало что известно об обмене другого синтезируемого из глутамина амида аспарагина в поджелудочной железе. Взаимопереход глутамин-аспарагин был констатирован еще в середине прошлого века [3], однако реакция аспарагин-глутамин в дальнейшем не была подтверждена школой Браунштейна [5]. Нами было показано, что в мозге не исключен синтез глутамина из аспарагина [2] и было бы интересно проследить за такой возможностью также в поджелудочной железе.

Материал и методика. Опыты проводили на белых крысах-самцах массой 180-200 г. Животные содержались на обычном пищевом рационе в условиях вивария Института биохимии НАН РА. Крыс после легкого эфирного наркоза забивали декапитацией, очищали поджелудочную железу от жировой мембраны, промывали охлажденным раствором 0.3М сахарозы в Трис-НСl буфере, pH 7.4, измельчали и гомогенизировали в 9 объемах Трис-сахарозы в стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пестиком. На пробу брали по 0.5 мл гомогената. Митохондриальную фракцию панкреаса получали методом дифференциального центрифугирования в Трис-сахарозе по модифицированному методу [11]. Аминокислоты панкреатических ТХУ экстрактов разделяли с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге и определяли нингидриновым методом [1]. Аммиак и глутамин определяли микродиффузионным методом [4]. Результаты подвергнуты статической обработке с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Из табл. 1 видно, что при инкубации глутамина в Трис-НСl буфере с митохондриальной фракцией поджелудочной железы имеет место статистически достоверное повышение содержания аммиака и недостоверное повышение дикарбоновых аминокислот и ГАМК.

Таблица 1. Содержание аминокислот и аммиака при инкубации глутамина с митохондриальной фракцией поджелудочной железы

ГН+добавки	ГН	ГК	АК	ГАМК	Аммиак
без инкуб.	10.1 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.08	0.25 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.02	0.6 $\pm$ 0.04
с инкуб.	9.5 $\pm$ 1.0	0.9 $\pm$ 0.1	0.35 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.04	0.9 $\pm$ 0.1*
NaH ₂ PO ₄	7.1 $\pm$ 0.5*	1.65 $\pm$ 0.2*	0.35 $\pm$ 0.03*	0.25 $\pm$ 0.06	1.8 $\pm$ 0.2*
АТФ	8.6 $\pm$ 0.6*	1.25 $\pm$ 0.15*	0.55 $\pm$ 0.05*	0.2 $\pm$ 0.02	1.75 $\pm$ 0.2*
ГК	9.2 $\pm$ 0.8	7.9 $\pm$ 0.9	1.1 $\pm$ 0.2*	0.38 $\pm$ 0.03*	1.1 $\pm$ 0.2*
α -КГ	7.8 $\pm$ 0.8*	1.5 $\pm$ 0.2*	0.45 $\pm$ 0.05*	0.19 $\pm$ 0.02	0.95 $\pm$ 0.1*

Примечание: Во все пробы добавлен глутамин (ГН) в количестве 10мкМ на пробу. Митохондриии инкубированы в Трис-НСl буфере, pH 7.5. В отдельные пробы добавлены NaH₂PO₄ в конечной концентрации 5мМ, АТФ-5мМ, ГК-8мМ, α -КГ-5мМ. Инкубационная смесь-1.0мл, время инкубации 40 мин $p < 0.05$ в сравнении с пробой без инкубации

Добавление фосфата в конечной концентрации в 5мМ стимулирует распад глутамина (7.1 мкМ против 10.1 мкМ) и статистически значимый прирост аммиака и дикарбоновых аминокислот. На содержание ГАМК фосфат не оказывает влияния. Аналогичное отмечается и под влиянием АТФ, но в менее выраженной степени. Добавление глутамата в инкубационную среду подавляет утилизацию глутамин-на, однако статистически значимо повышает выход аспартата, ГАМК и аммиака. Эти данные схожи с ранее полученными нами данными с митохондриями мозга и подтверждают известный факт наличия почечного и мозгового типа фосфатактивируемой глутаминазы в поджелудочной железе [12, 13].

Исходя из аналогии обмена нейроактивных аминокислот в мозге и поджелудочной железе, нами также был исследован обмен аспарагина в гомогенатах поджелудочной железы. Ранее нами было показано, что в мозге в какой то степени возможен синтез глутамина и глутамата из аспарагина [2] и представляет интерес изучение подобной возможности в панкреасе.

Таблица 2. Содержание аминокислот и аммиака при инкубации аспарагина с гомогенатами поджелудочной железы

АН + добавки	ГН	ГК	АК	NH ₃
ГК безинк.	-	9.8±1.1	-	0.9±0.08
-	1.5±0.02*	0.1±0.02	2.1±0.02	0.9±0.03
ГК	-	9.5±1.2	-	0.75±0.05
ГК + α-КГ	-	9.3±0.9	-	2.2±0.4*
ГК + АТФ	2.3±0.3*	8.9±0.8	-	0.7±0.08
α-КГ	2.1±0.07*	0.5±0.04	2.2±0.3	0.08±0.01
α-КГ + АТФ	-	0.8±0.09	-	1.2±0.08
ГК+α-КГ+АТФ	-	9.3±0.9	-	0.8±0.08

Примечание. Во все пробы добавлен аспарагин в конечной концентрации 8мМ. Инкубационная смесь содержала: 0.1М К-фосфатный буфер, рН 7.5, 0.05М Tris-HCl буфер, рН 7.5, 0.12М MgSO₄. В отдельные пробы добавлены глутамат (ГК)-8мМ, α-кетоглутарат (α-КГ) – 5мМ, АТФ – 5мМ. Инкубация 40мин при 37°С. Реакцию останавливали добавлением ТХУ в конечной концентрации 3.3%. ГК-глутамат, ГН-глутамин, АК-аспартат, АН-аспарагин. n=5. *- p < 0.05.

Как видно из табл. 2 инкубация гомогенатов поджелудочной железы с аспарагином приводит к образованию аспартата и глутамина без изменения уровня аммиака. Добавление глутамата подавляет выход глутамина, однако в присутствии АТФ выход глутамина в сравнении только с глутаматом возрастает. Выход глутамина из аспарагина отмечается также в присутствии кетоглутарата, который повышает также концентрацию аспартата и резко снижает уровень аммиака. При добавлении вместе с кетоглутаратом глутамата образования глутамина не отмечается, при этом резко повышается продукция аммиака. Интересно, что эти результаты аналогичны ранее полученным нами в мозге крыс [2]. Полученные результаты свидетельствуют о сходстве метаболизма нейроактивных аминокислот и их амидов в нервных и панкреатических островковых клетках.

ЛИТЕРАТУРА

1. Камалян Р.Г., Бунятян Г.Х., Мовсесян С.Г. Участие некоторых нуклеотидов и пиридоксальфосфата в превращениях глутамата в митохондриальной фракции мозга. *Вопр. биохим. мозга*. Изд. АН Арм.ССР. 21,5, 16-26. 1968.
2. Камалян Р.Г., Варданян А.Г., Хачатрян Н.Х., Григорян А.Г. Некоторые особенности обмена дикарбоновых аминокислот в мозге крысы. *Доклады НАН Армении*. 113,1, стр. 59-65, 2013.
3. Лестровая Н.Н. О синтезе глутамина и аспарагина в тканях животного организма. *Биохимия*. 4, 478-484, 1954.
4. Силакова А.И., Труш Г.П., Являкова А. Микрометод определения аммиака и глутамина в тканевых ТХУ экстрактах. *Вопр. мед. химии*. 5, 538-542. 1962.
5. Сюй Тин-Сень. Механизм образования глутамина из аспарагина и глутаминовой кислоты в тканях животных. *Биохимия*. 24, 3, 528-534, 1959.

6. Brice N.L., Varadi A., Ashcroft S.J., Molnar E. Metabotropic glutamate and GABA (B) receptors contribute to the modulation of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells. *Diabetologia*, 45, 242-252, 2002.
7. Dong H., Kumar M., Zhang Y., Gyulkhandanyan A., Xiang Y.Y., Ye B., Perrella J., Hyder A., Zhang N., Wheeler M., Lu W.Y., Wang Q. Gamma-aminobutyric acid up- and downregulates insulin secretion from beta cells in concert with changes in glucose concentration. *Diabetologia*, 49, p. 697-705, 2006.
8. Fahien L.A., MacDonald M.J. The complex mechanism of glutamate dehydrogenase in insulin secretion. *Diabetes*, 60, 10, 2450-2454, 2011.
9. Gerber J.C., Hare T.A. GABA in peripheral tissue, with emphasis on the endocrine pancreas: presence in two species and reduction by streptozotocin. *Diabetes*, 28, 12, 1073-1076, 1979.
10. Gladkevich A., Korf J., Hakobyan V.P., Melkonyan K.V. The peripheral GABAergic system as a target in endocrine disorders. *Auton Neurosci*. 124, 1-2, 1-8, 2006.
11. Hodarnau A., Dancea C., Barzu O. Isolation of highly purified mitochondria from rat pancreas. *The Journal of Cell Biology*. 59, p. 222-227, 1973.
12. Malaisse-Lagae F., Sener A., Garsia-Morales P. The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. Influence of nonmetabolized analog of leucine on the metabolism of glutamine in pancreatic islets. *J. Biol. Chem.*, 257, 3754-3758, 1982.
13. Michalik M., Erecinska M. GABA in pancreatic islets: metabolism and function. *Biochem. Pharmacol.*, 44, 1, pp. 1-9, 1992.
14. Sorenson R.L., Garry D.G., Brelje T.C. Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans. *Diabetes*, 40, p. 1365-1374, 1991.
15. Wan Y., Wang Q., Prud'homme G.J. GABAergic system in the endocrine pancreas: a new target for diabetes treatment. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, 8, p. 79-87, 2015.

Поступила 10.04.2019