



УДК 577.15+577.3+591.39

К РЕГУЛЯЦИИ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ТКАНИ МОЗГА КУР В ХОДЕ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ

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

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

В обзорах последних лет, посвященных регуляции цикла трикарбоновых кислот, особое внимание уделено механизмам, контролирующим скорость начальных реакций цикла в тканях млекопитающих [1, 2]. В мозговой ткани NAD-зависимая изоцитратдегидрогеназа (NAD-ИЦДГ) включена в функциональный ансамбль, обеспечивающий сопряженное течение лимитирующих этапов цикла; у растущих животных отмечено заметное участие в нем и NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы (NADP-ИЦДГ) [2]. Возрастная эволюция характера окисления изоцитрата различными дегидрогеназами свидетельствует об адаптационных сдвигах в регулирующих системах, ответственных за метаболизм изоцитрата в мозгу млекопитающих. Регуляторные воздействия на активность ИЦДГ большинство авторов связывает с конформационной перестройкой: изменением различных функциональных групп в молекуле фермента [3], сдвигами в его агрегатном состоянии [4]. В предыдущей работе прослежены пути преимущественного окисления изоцитрата NAD- и NADP-ИЦДГ в мозгу кур в онтогенезе [5]. В настоящем сообщении излагаются результаты исследований влияния предшественника и продукта распада изоцитрата (цитрата и α -кетоглутарата) на активность NAD- и NADP-ИЦДГ в ходе дифференциации ткани мозга кур.

Опыты проводили на цитоплазме и митохондриях мозга 20-дневных эмбрионов, 3-дневных цыплят (ранний постэмбриональный период) и зрелых кур. Субклеточные фракции мозга получали описанным ранее методом; активность ИЦДГ определяли спектрофотометрически [5]. В каждой серии опытов предварительно определяли скорость реакции, катализируемой соответствующей ИЦДГ, в присутствии различных концентраций субстратов, после чего использовали концентрации, добавление которых вызывало максимальный и достоверный эффект. О действии использованного эффектора судили по изменению ферментативной активности, выражаемому в процентах относительно контроля.

Изучение влияния цитрата на активность митохондриальной NAD-ИЦДГ, цитоплазматической и митохондриальной NADP-ИЦДГ мозга кур в процессе онтогенетического развития показало, что он вызывает повышение активности обеих ИЦДГ (рис. 1). При этом его активирующее действие на NADP-ИЦДГ в обеих фракциях мозга проявляется уже при концентрации 0,5 мМ, в то время как примерно такое же активирование NAD-ИЦДГ наблюдается при гораздо более высокой (20 мМ) концентрации. Эффект цитрата несколько более выражен на ранних стадиях онтогенеза.

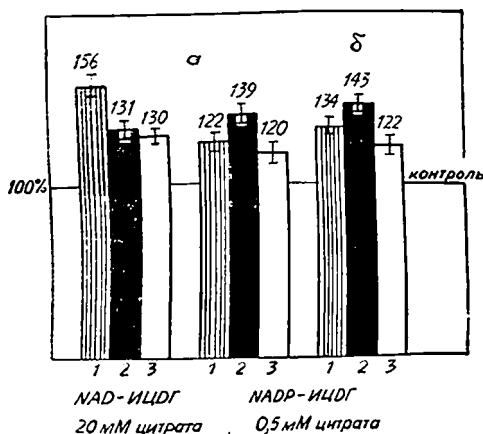


Рис. 1. Влияние цитрата на активность NAD- и NADP-зависимых изоцитратдегидрогеназ в митохондриальной (а) и цитоплазматической (б) фракциях мозга кур в онтогенезе. 1—эмбрионы, 2—цыплята, 3—куры

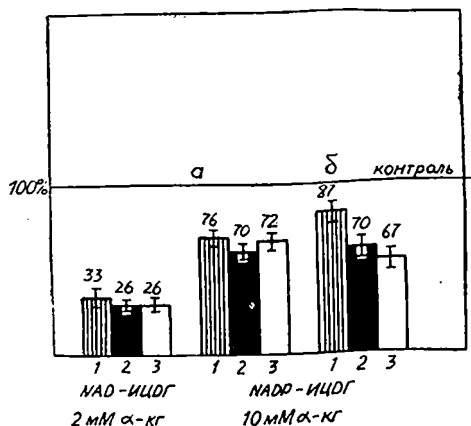


Рис. 2. Влияние α-кетоглутарата на активность NAD- и NADP-зависимых изоцитратдегидрогеназ в митохондриальной (а) и цитоплазматической (б) фракциях мозга кур в онтогенезе. Обозначения те же, что на рис. 1

Далее была исследована скорость окисления изоцитрата по NAD—или NADP-зависимому пути в связи с уровнем содержания α-кетоглутарата в среде и стадией развития кур. Полученные данные показали (рис. 2), что добавление α-кетоглутарата в концентрации

2 мМ вызывает резкое ингибирование NAD-ИЦДГ, не проявляющее существенных онтогенетических сдвигов. В отношении NADP-ИЦДГ подавление активности в пределах 30% наблюдается в онтогенезе в присутствии 10 мМ α -кетоглутарата.

Влияние цитрата на активность NADP-ИЦДГ изучено на дрожжах [6] и цитоплазме мозга крыс [7]; активирование им NAD-ИЦДГ наблюдалось с ферментами бактериального [8], растительного [9] и животного [10] происхождения. При высоком содержании в инкубационной среде Mg^{2+} активирование NAD-ИЦДГ в бычьем [11] и курином мозгу проявляет сходную закономерность. Активация двух форм ИЦДГ разными концентрациями цитрата, возможно, обусловлена значительным различием в K_m для изоцитрата у этих ферментов [12], в частности, тем обстоятельством, что NAD-ИЦДГ функционировует в митохондриях в условиях ненасыщения субстратом [13]. Поэтому в стимулировании NAD-ИЦДГ большими дозами цитрата может играть определенную роль смещение аконитазного равновесия в сторону изоцитрата [14].

В отношении влияния α -кетоглутарата на активность двух ИЦДГ данные, аналогичные с нашими, получены на NADP-ИЦДГ из митохондрий печени и сердца мышей [15], однако NAD-ИЦДГ из растительных и бактериальных источников подавляется очень высоким (выше 20 мМ) концентрациями α -кетоглутарата [4, 16]. Hartman [17] показал, что неметаболизируемый аналог α -кетоглутарата, являющийся специфическим реагентом для α -кетоглутаратсвязывающих участков в молекуле NADP-ИЦДГ, в концентрации 0,1 мМ вызывает резкое ингибирование коммерческого препарата этого фермента. Этот факт свидетельствует о зависимости эффекта ингибирования ИЦДГ α -кетоглутаратом от степени его утилизации. Показано, что скорость окисления изоцитрата в мозгу млекопитающих в значительной степени зависит от утилизации образовавшегося α -кетоглутарата в реакциях трансаминирования с аспаратом при участии D-аспартат- α -кетоглутарат-аминотрансферазы [1, 7]. Неодинаковый по величине эффект α -кетоглутарата на активность двух ИЦДГ мозга кур может быть связан со структурными особенностями ферментов.

Как видно из полученного онтогенеза, низкими концентрациями цитрата, сопоставимыми с его содержанием в тканях в физиологических условиях, может вносить заметный вклад в генерирование NADPH и согласуется с интенсивным биосинтезом белков и липидов в ходе созревания мозга. Высокая скорость синтеза цитрата в мозгу растущих животных [2] создаст реальную основу для осуществления его регуляторного эффекта на активность NADP-ИЦДГ.

REGULATION OF ISOCITRATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN HEN BRAIN DURING DEVELOPMENT

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

Institute of Biochemistry, Arm. SSR Academy of Sciences, Yerevan

The effect of citrate and α -oxoglutarate on the activity of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases was examined in hens brain during ontogenesis. It was shown, that NADP-dependent enzyme is activated by low citrate concentration (0,5 mM), the activation being more pronounced at the end of embryogenesis and at the beginning of postembryogenesis. The low concentration of α -oxoglutarate (2 mM) is inhibitory only for NAD-dependent enzyme, without significant developmental changes.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Williamson J. R., Cooper R. H. FEBS Lett., v. 117, suppl., p. K73—K85, 1980.
2. Ещенко Н. Д. Нейрохимия т. 1, № 2, с. 200—213, 1982.
3. Fan C. C., Lin J. F., Plaut G. W. E. J. Biol. Chem., v. 250, № 6, p. 2022—2027, 1975.
4. LeJohn H. B., McCrea B. E., Suzuki I., Jackson S. J. Biol. Chem., v. 244, № 9, p. 2484—2493, 1969.
5. Арутюнян Л. А., Симонян А. А., Симонян Р. А. Нейрохимия, т. 2, № 4, с. 417—420, 1983.
6. Bernofsky C., Utter M. F. J. Biol. Chem., v. 241, № 22, p. 5461—5466, 1966.
7. Gromeck A., Rafalowska U. J. Neurochem., v. 19, № 11, p. 2687—2695, 1972.
8. Sanwal B. D., Cook R. A. Biochemistry, v. 5, № 3, p. 886—894, 1966.
9. Cox G. F., Davies D. D. Biochem. J., v. 105, № 2, p. 729—734, 1967.
10. Cohen P. F., Colman R. F. Biochemistry, v. 11, № 8, p. 1501—1508, 1972.
11. Willson V. J. C., Tipton K. F. J. Neurochem., v. 34, № 4, p. 793—799, 1980.
12. Plaut G. W. E., Aogaichi T. J. Biol. Chem., v. 243, № 21, p. 5572—5583, 1968.
13. Sies H., Akerboom P. M., Tager J. M. Eur. J. Biochem., v. 247, № 2, p. 209—214, 1972.
14. England P. J., Denton R. M., Randle P. J. Biochem. J., v. 105, № 2, p. 32c—33c, 1967.
15. Fox D. J., Crockett R. V. Biochem. Med., v. 18, № 2, p. 192—205, 1977.
16. Couttate T. P., Dennis D. T. Eur. J. Biochem., v. 7, № 2, 153—158, 1969.
17. Hartman F. C. Biochemistry, v. 20, № 4, p. 894—898, 1981.

Поступила 21. II 1985