ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՌ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱՅԻ ԶԵԿՈՒՅՑՆԵՐ
ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

XLI 1965 3

БИОХИМИЯ

С. Г. Мовсесян и Г. Х. Бунятян, академик АН Армянской ССР

О роли никотинамидаденин-динуклеотидов в образовании аммиака в мозгу

(Представлено 28/VI 1965)

В течение последних лет ряд исследований нашей лаборатории был посвящен вопросам механизма образования свободного аммиака в мозговой ткани. Исследования многих авторов показали, что источником свободного аммиака в мозговой ткани являются амидные группы белков, глутамин и адениловая кислота (AMP). Однако при инкубации срезов мозга убыль этих источников не покрывает прироста аммиака, что указывает на наличие дополнительных источников аммиака, которые, в основном, переходят в трихлоруксусный экстракт ([1]). С другой стороны, не выяснен механизм образования аммиака из аминокислот, не только в мозговой, но и других органах. Согласно исследованиям А. Е. Браунштейна ([2]) свободный аммиак образуется путем трансдезаминирования через глутаминовую кислоту. Однако рядом исследований показано, что дегидрогеназа глутамата малоактивна и и при наличии малых количеств аммиака и α-кетоглутарата дезаминирование глутамата смещается в обратную сторону — его синтеза ([3]). Помимо этого, глутаминовая кислота в мозговой ткани в большинстве случаев выступает в роли не образователя аммиака, а его устранителя, путем образования глутамина. Как показано рядом авторов ([4, 5]), а также нашими исследованиями ([6]), глутаминовая кислота почти на 80—90% переходит в аспарагиновую. Таким образом, в аминокислотном обмене мозговой ткани значительный интерес представляет аспарагиновая кислота. В настоящее время установлено, что аспарагиновая кислота с инозиновой образует аденилосукцинат, который переходит в адениловую кислоту. Синтез аденилосукцината был обнаружен в экстрактах костного мозга ([7]), в дрожжах ([8]), бактериях (*Esch. coli*) ([9]). Затем аминирование инозиновой кислоты при участии аспарагиновой было показано в скелетной мышце многими авторами ([10–12]). В отношении участия аспарагиновой кислоты в реаминировании инозиновой в мозговой ткани имеется ряд исследований ([13]).

П. А. Кометиани и сотр. придают важное значение в образовании свободного аммиака реаминированию инозиновой кислоты ([13]). По их данным в реаминировании инозиновой кислоты, кроме аспарагино-

вой, участвуют глутамат и гамма-аминомасляная кислота. Однако, как показали исследования других авторов ([10]), инозиновая кислота не реаминируется с глутаматом и гамма-аминомасляной кислотой. Об этом свидетельствует и ряд исследований, проведенных в нашей лаборатории. Выяснение роли системы: аспартат + инозиновая кислота → аденилосукцинат → адениловая кислота + фумарат

↓

инозиновая кислота + NH_3

в образовании свободного аммиака в мозговой ткани явилось предметом и наших исследований.

Результаты, полученные нами в этом направлении, свидетельствуют о малом выходе свободного аммиака при добавлении инозиновой кислоты и аспартата к препаратам мозговой ткани. В настоящее время нами изучаются условия, обеспечивающие оптимальную активность этой системы.

В последние годы С. Г. Мовсесян, изучая некоторые вопросы регуляции гликолитического цикла в митохондриальной фракции мозга и превращения никотинамидаденин-динуклеотида (NAD), заинтересовался вопросом дезаминирования последнего и установил, что NAD является эффективным источником образования аммиака. Полученные им результаты побудили нас более детально изучить вопросы участия никотинамидаденин-динуклеотидов, среди других адениннуклеотидов, в образовании свободного аммиака.

Многочисленными исследованиями установлено, что микроорганизмы, растения и животные ткани содержат ряд ферментов (нуклеозидаза, пирофосфорилаза, дезаминаза, дезамидаза), катализирующих определенные процессы распада NAD.

В мозговой ткани из этих ферментов обнаружена только NAD-нуклеозидаза (NAD-аза), под действием которой из NAD отщепляется аденозиндифосфатрибоза и никотинамид ([14, 15]). NAD-аза мозговой ткани весьма активна, и действие ее тормозится никотинамидом. Пирофосфатаза, расщепляющая NAD на аденин- и никотинамид-мононуклеотиды ([14, 15]), весьма активна в других тканях, но отсутствует в мозговой ткани. Вопросы дезаминирования и дезамидирования NAD в мозговой ткани не изучены.

Опыты проводили на крысах. После декапитации животного быстро извлекали головной мозг и переносили в охлажденный стакан. Тщательно удаляли мягкую мозговую оболочку и измельчали мозг ножницами. Гомогенизацию проводили с 9 объемами 0,25 М раствора сахарозы (pH—7,4) в ручном гомогенизаторе, сконструированном по модели Даунса. Фракционирование гомогената производили по методу Броди и Бейна, видоизмененному Палладиным и Кирсенко. Гомогенат центрифугировали на холоду (0—4°С) для удаления ядер при 800—900 × *g* 10 минут. Фракцию митохондрий отделили путем центрифугирования надосадочной жидкости в течение 15—20 минут при 18 000—20 000 × *g*.

На каждую пробу брали такое количество митохондрий, которое соответствует 500 *мг* свежей ткани (≈4,8—5,4 *мг* митохондриального белка). Расчеты производили на 1 *мг* белка, который определяли по методу Лоури и сотр. Аммиак определяли микрометодом Зелигсона в модификации Силаковой и сотр. Инкубационная смесь содержала 0,1 *мл* 0,133 *М* к-фосфатного буфера (pH—7,4), 0,15 *мл* 0,2*М* Трис—HCl буфера (pH—7,45), 0,1 *мл* 0,12*М* $MgSO_4$, 0,5 *мл* митохондрий (≈4,8—5,4 *мг* белка) и 0,25*М* сахарозу (pH—7,4) до 1,5 *мл*. NAD, NADH, NADP и никотинамид (NA) добавляли по 2 *мг* на пробу, AMP по 1 *мг*. Инкубацию проводили при 37° в течение 1 часа в атмосфере воздуха.

Таблица 1

Образование аммиака из никотинамидаденин-динуклеотидов в митохондриальной фракции мозговой ткани крыс (в *мкг* на 1 *мг* белка)

Фиксированный контроль	Контроль без добавления (инкуб.)	NA	NAD	NADH	NADP
0,64	1,32	1,63	3,73	3,86	2,72
0,68	1,67	1,71	2,3	2,54	1,85
1,25	1,6	1,75	2,88	2,71	1,6
0,83	1,5	1,72	3,15	3,18	2,1
0,95	1,58	1,56	3,0	3,04	2,08
0,87 (5)	1,53 (5)	1,63 (5)	3,01 (5)	3,06 (5)	2,07 (5)

Из табл. 1 видно, что исходное количество аммиака в митохондриях составляет 0,87 *мкг* на 1 *мг* белка. После инкубации содержание аммиака возрастает до 1,53 *мкг* на 1 *мг* белка, т. е. увеличивается на 76%. При добавлении NA уровень аммиака не претерпевает заметных изменений (1,63 *мкг* на 1 *мг* белка) по сравнению с контрольными опытами. В присутствии добавленного NAD количество аммиака значительно увеличивается и достигает 3,01 *мкг* на 1 *мг* белка, т. е. примерно в два раза больше, по сравнению с контрольной пробой.

Прирост аммиака в присутствии добавленного NADH примерно такой же, как в случае NAD (3,06 *мкг* на 1 *мг* белка). NADP также способствует образованию аммиака, хотя и в меньшей степени, чем NAD (2,07 *мкг* на 1 *мг* белка ≈35,9%).

Учитывая высокую нуклеозидазную активность мозговой ткани и ингибирование ее никотинамидом в дальнейшем, мы проводили опыты с добавлением никотинамида. Результаты этих опытов (табл. 2) показывают, что при сочетании NAD и NA количество продуцируемого аммиака значительно выше по сравнению с пробами, где добавлялся только NAD. Так, например, в пробах NAD + NA продуцируется 4,08 *мкг* аммиака, тогда как в опытах с одним NAD—3,01 *мкг* на 1 *мг* белка.

По всей вероятности, источником аммиака в NAD является аминогруппа аденина, так как свободный NA не приводит к повышению уровня аммиака (табл. 1). Однако нельзя полностью отрицать и не-

которое дезамидирование NAD. Не исключена возможность дезамидирования NA при включении его в NAD.

Представляло интерес сравнить действие NAD на процесс аммиакообразования мозга с AMP. Из табл. 2 видно, что при добавлении 1 *мг* AMP образуется примерно такое же количество аммиака (4,32 *мкг*), как в случае добавления эквимолекулярного количества NAD.

Таблица 2

Образование аммиака из NAD при его стабилизации NA и из AMP в митохондриях мозга крыс (в *мкг* на 1 *мг* белка)

Контроль без добавлений	NAD+NA	AMP
1,32	5,18	4,48
1,67	3,82	4,44
1,6	3,55	4,16
1,5	3,86	4,22
1,58	4,0	
1,53 (5)	4,08 (5)	4,32 (4)

Расчеты показывают, что в процесс аммиакообразования вовлекается примерно 33—37% добавленного NAD и AMP. Мирский и сотр. установили, что в печеночной ткани и щитовидной железе дезаминаза адениловой кислоты локализована в основном в ядрах ([16]). Наши же и другие исследования нашей лаборатории указывают на наличие этого фермента в митохондриальной фракции мозговой ткани ([17]). Как отмечалось выше NAD-пирофосфатазная активность отсутствует в мозговой ткани, т. е. исключается превращение NAD в AMP. Однако, учитывая значительное образование аммиака из AMP в митохондриальной фракции, можно было думать, что некоторая часть NAD переходит в AMP, из которой продуцируется аммиак. Для выяснения этого вопроса мы сочли необходимым определить количество неорганического фосфата, имея в виду, что AMP в митохондриях мозга распадается с выделением ортофосфата ([15]).

Из табл. 3 видно, что в пробах с NAD ортофосфат не образуется вовсе, тогда как при добавлении AMP его количество заметно увеличивается в реакционной среде (14,35 *мкг* на 1 *мг* белка), что еще раз свидетельствует о том, что мозг не расщепляет NAD на отдельные нуклеотиды.

Таблица 3

Прирост неорганического фосфата при добавлении к митохондриям мозга NAD и AMP (в *мкг* на 1 *мг* белка)

NAD	AMP
0	13,23
0	15,13
0	14,53
0	14,53
0	14,35 (4)

Состав инкубационной среды: 0,25 *мл* 0,2М трис—HCl буфера (pH—7,45), 0,1 *мл* 0,12 М $MgSO_4$, 0,5 *мл* митохондрий (≈4 *мг* белка) и 0,25М сахарозу (pH—7,4) до 1,5 *мл*. Инкубация при 37° 1 час. Газовая фаза — воздух.

Следует отметить, что образование свободного аммиака из NAD мы наблюдали также в ядерной фракции и в гомогенатах мозга.

Полученные нами результаты позволяют заключить, что одним из источников аммиака в мозговой ткани является NAD. Имея в виду достаточное количество NAD в мозгу — примерно 23 *мг* % ([18]), можно считать, что он играет важную роль в процессе аммиакообразования.

Согласно данным Ленинджера и сотр., значительное количество митохондриального NAD не связано с дыхательной цепью. Не исключена возможность участия NAD и во многих других биохимических процессах, происходящих в различных тканях, в частности в аммиакообразовании. Большой интерес в этом отношении представляет выяснение вопросов, касающихся реаминирования никотинамидинозиндинуклеотида (образующегося при дезаминировании NAD) и роли этого процесса в дезаминировании аминокислот, а также влияния остатка инозин-нуклеотида на окислительно-восстановительные процессы. Исследования в этом направлении находятся в процессе разработки.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Ս. Գ. ՄՈՎՍԻՍՅԱՆ ԵՎ Հ. Ե. ԲՈՒՆՅԱԹՅԱՆ, Հայկական ՍՍՌ ԳԱ ակադեմիկոս

Նիկոտինամիդադենին–դինուկլեոտիդների դերը ամոնիակի առաջացման պրոցեսում ուղեղային հյուսվածքում

Գլխուղեղի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում ուսումնասիրվել է ամոնիակի գոյացումը նիկոտինամիդադենին–դինուկլեոտիդի օքսիդացած (NAD) և վերականգնված (NADH) ձևերից, ինչպես նաև նիկոտինամիդադենին-դինուկլեոտիդֆոսֆատից (NADP)։ Ամոնիակի անջատումը ավելի ակնառու է, երբ NAD-ը ենթարկվում է կայունացման նիկոտինամիդի (NA) ավելացմամբ։ Ամոնիակի գոյացումը նիկոտինամիդադենին–դինուկլեոտիդներից կարելի է բացատրել երկու եղանակով. առաջին նրանց գնգամիդացմամբ (նիկոտինամիդից) և երկրորդ գնգամինացմամբ (ադենինից)։

Առաջին պրոցեսը քիչ հավանական է, քանի որ միտոքոնդրիաներում NA գնգամիդուկլեոտիդի առաջացումը նոր ուղիներ է բացում կապված վերջինիս նշանակության հետ ատոմ ամոնիակի առաջացման գործում և օքսիդացման պրոցեսներում։ Զուրկ չէ հնարավորությունից, որ NAD-ը կարող է վերամինացվել ամինոթթուների՝ հատկապես ասպարագինաթթվի հաշվին։ Ինչպես ցույց են ավել մեր փորձերի արդյունքները միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում ամոնիակ է առաջանում զգալի քանակությամբ նաև ադենիլաթթվից (AMP), սակայն նրա առաջացումը նիկոտինամիդադենին–դինուկլեոտիդներից բացակայում է, քանի որ ուղեղային հյուսվածքը զուրկ է NAD-պիրոֆոսֆատազային ակտիվությունից և բացի այդ AMP-ի ավելացման դեպքում անջատվում է անօրգանական ֆոսֆատ, մինչդեռ այդ երևույթը տեղի չի ունենում NAD-ի ավելացման դեպքում։ Նիկոտինամիդադենին–դինուկլեոտիդներից ամոնիակի անջատման փաստը գիտվել է նաև կորիդային ֆրակցիայի և հոմոգենատների հետ կատարած փորձերում։

ЛИТЕРАТУРА—ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

[1] *Е. Э. Клейн.* Третья Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы, Ереван, 193, 1963. [2] *А. Е. Браунштейн.* Биохимия аминокислотного обмена, изд. АМН СССР, М., 1949. [3] *Г. И. Стрекер.* Arch. Biech. 46, 128, 1953. [4] *Б. Дж. Хаслам, Х. А. Кребс,* Biochem. J., 88, 556, 1963. [5] *Е. Б. Чейн* и др. Proc. Roy. Soc., B. 156, 144, 1962. [6] *Г. Х. Бунятян,* Журн. Всесоюзн. общества им. Д. И. Менделеева, 9, 412, 1964. [7] *Р. Абрамс и М. Бентли.* Arch. Biochem. Biophys., 56, 184, 1955. [8] *К. Е. Картер, Л. Х. Коэн.* J. biol. chem., 222, 17, 1956. [9] *И. Либерман.* J. biol. chem., 233, 327, 1956. [10] *Е. Ф. Ефимочкина, А. Б. Браунштейн,* Arch. Biochem. Biophys., 83, 350, 1959. [11] *П. А. Кометиани.* „Биохимия", 24, 729, 1959. [12] *А. А. Ньютон* и *С. В. Перри,* Biochem. J., 74, 127, 1960. [13] *П. А. Кометиани* и др., Вопросы биохимии нервной и мышечной систем, изд. „Мецниереба", Тбилиси, 1965. [14] *А. Корнберг* и *О. Линдберг,* J. biol. chem., 176, 665, 1948. [15] *К. Б. Якобсон* и *Н. О. Каплан,* J. Biophys. Biochem. Cytol., 3, 31, 1957. [16] *В. Олфри* и др., Nature, 169, 128, 1952. [17] *Г. Х. Бунятян* и *А. В. Арутюнян,* ДАН АрмССР, т. XL, 209 (1965). [18] *М. Диксон* и *Э. Уэбб,* Ферменты, М., 1961.