

С. Г. Мовсесян, Р. Г. Камалян

К вопросу образования НАД-сукцината из добавленных НАД и фумарата в митохондриальной фракции печеночной ткани кроликов

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 22/II 1968)

Биосинтез адениловой кислоты (АМФ) из инозиновой кислоты (ИМФ) и аспарагиновой кислоты (АК), как показал ряд исследований (1-7) происходит через образование промежуточного соединения—аденило-сукцината (АМФ-С). Последний расщепляется под действием аденило-сукциназы на АМФ и фумарат. Установлена обратимость этого процесса—из АМФ и фумарата вновь синтезируется АМФ-С.

Кислотный или щелочной гидролиз АМФ-С приводит к образованию АК и ИМФ (6,8). Обнаружение АК при гидролизе АМФ-С является одним из способов его идентификации.

В настоящей работе мы задались целью изучить возможность образования из НАД и фумарата НАД-сукцината, как промежуточного продукта, на пути реаминирования Д-НАД в митохондриальной фракции печеночной ткани, со стороны АК.

Образование НАД-сукцината изучали в условиях смещения равновесия прямой реакции в обратную сторону, что осуществлялось повышением концентрации НАД и особенно фумарата в реакционной смеси.

Подопытными животными служили кролики. После их обезглавливания быстро извлекали печень, промывали ее 0,25 моллярным раствором сахарозы (рН 7.4, 1—2°C) и готовили кашицу, из которой получали митохондриальную фракцию по методу, описанному в предыдущей работе (9). Количество используемой для каждого опыта митохондриальной фракции соответствовало 500 мг свежей печеночной ткани (4,4—5,8 мг митохондриального белка). Инкубационная смесь содержала: 0,1 мл 0,133 моллярного К-фосфатного буфера (рН 7,4); 0,15 мл 0,2 моллярного трис-НСl буфера (рН 7.4), 0,1 мл 0,12 моллярного раствора $MgSO_4$, 0,5 мл митохондриальной фракции. На каждую пробу в зависимости от условий опыта добавляли в микромолях:

НАД-2,86 и 5,72; АМФ-2,8 и 5,6; НА-16,4 и 32,8. Фумарат, сукцинат, АК и ГК добавляли на пробу по 26 мкмоль. Объем инкубационной жидкости—1,5 мл. Инкубацию проводили при 37° в течение 2 часов в атмосфере воздуха.

Белки осаждали добавлением ТХУ (конечная концентрация 2%). Из надосадочной жидкости липиды и осадитель удаляли трехкратной экстракцией эфиром (эфир брали в двойном объеме и предварительно насыщали дистиллированной водой в отношении 2:1). Затем пробы подвергали лиофильной сушке. К сухому остатку добавляли насыщенный раствор Ва (ОН)₂ и ставили на гидролиз при 100—102°С в запаянных пробирках в течение 20 часов. После гидролиза барий осаждали Н₂SO₄, отделяли осадок центрифугированием и в супернатанте определяли АК методом бумажного электрофореза. Электрофорез проводили в пирин-ацетатном буфере 1:3,75 (1,6 мл пиридина + +6 мл ледяной уксусной кислоты + дистиллированная вода до 1 л). Электрический ток подавали в 1000—1250 в от 2,5 до 3 миллиампер на ленту. Длительность разделения 1,5—2 часа. АК выявляли раствором нингидрина в ацетоне, 20 минутной экспозицией при 80°С. Данные высчитывали в мкг на 1 мг белка. Белок определяли по методу Лоури и сотр. ⁽¹⁰⁾, аммиак микрометодом Зелигсона в модификации Силаковой и сотр. ⁽¹¹⁾.

Таблица 1
Действие сукцината и фумарата на образование аммиака из добавленных НАД, АМФ в митохондриальной фракции печеночной ткани

Условия опыта	Содержание свободного аммиака по сравнению с инкубированным контролем в мкг/мг белка
Сукцинат	$-1,0 \pm 0,3$ (6)
Фумарат	$-1,5 \pm 0,18$ (6)
НАД+НА	$2,8 \pm 0,42$ (6)
НАД+НА+сукцинат	$-1,0 \pm 0,28$ (6)
НАД+НА+фумарат	$-1,1 \pm 0,34$ (6)
АМФ	$4,2 \pm 0,6$ (6)
АМФ+сукцинат	$-0,2 \pm 0,1$ (6)
АМФ+фумарат	$-1,5 \pm 0,16$ (6)

В опытах без добавлений (инкубированная проба) образуется $2,4 \pm 0,4$ мкг аммиака на 1 мг белка.

Прежде чем приступить к изучению образования НАД-сукцината из добавленного НАД и фумарата в первую очередь интересно было

выяснить действие фумарата и сукцината на образование свободного аммиака из НАД и АМФ в митохондриальной фракции печени.

Проведенные исследования показали (табл. 1), что в присутствии добавленного фумарата, или сукцината наблюдается некоторое уменьшение продукции эндогенного аммиака по сравнению с инкубированным контролем (проба без добавлений). Интересно отметить, что оба субстрата полностью ингибируют деаминирование НАД и АМФ. Так, например, в пробах с НАД+НА (НА-никотинамид добавляли для ингибирования остаточной активности немитохондриального фермента, НАД-нуклеозидазы, расщепляющей НАД на аденозин-дифосфат-рибозу и НА) образуется $2,8 \pm 0,42$, а с АМФ $4,2 \pm 0,6$ $\mu\text{кг}$ свободного аммиака. Между тем уровень последнего в опытах НАД+НА+фумарат, НАД+НА+сукцинат, АМФ+фумарат и АМФ+сукцинат по сравнению с контрольными опытами понижается на $1,0 \pm 0,28$; $1,1 \pm 0,3$; $0,2 \pm 0,1$ и $1,5 \pm 0,16$ $\mu\text{кг}$ на 1 $\mu\text{г}$ белка соответственно.

Действие сукцината на деаминирование НАД и АМФ, по всей вероятности, обусловлено его переходом в фумарат.

На основании вышеприведенных результатов можно предполагать, что фумарат предотвращает отщепление аммиака из НАД и АМФ путем присоединения к амино группе аденина указанных нуклеотидов и образования НАД-сукцината и АМФ-сукцината.

Следует отметить, что тормозящее действие фумарата на эндогенное аммиакообразование проявляется гораздо слабее, чем на деаминирование НАД и АМФ. Некоторое уменьшение уровня эндогенного аммиака под действием фумарата можно объяснить или подавлением деаминирования эндогенных аденин-нуклеотидов или же усилением восстановительного аминирования α -кетоглутарата путем генерации последнего, а также НАДН и НАДФН. Однако необходимо учесть, что ввиду недостаточности эндогенных резервов активного ацетата в митохондриальной фракции, вряд ли второй путь может играть существенную роль.

В дальнейшем выяснилось (табл. 2), что как фумарат, так и сукцинат резко подавляют стимулирующее действие Д-НАД на образование свободного аммиака из АК. Из табл. 2 явствует, что АК сама по себе в митохондриальной фракции печеночной ткани продуцирует лишь незначительное количество свободного аммиака ($1,43 \pm 0,57$ $\mu\text{кг}$ на 1 $\mu\text{г}$ белка). При сочетании АК с Д-НАД уровень образовавшегося аммиака резко возрастает, достигая $8,77 \pm 0,63$ $\mu\text{кг}$ на 1 $\mu\text{г}$ митохондриального белка, при этом сильно повышается и утилизация АК ($209,7 \pm 10,0$ $\mu\text{кг}$ на 1 $\mu\text{г}$ белка).

Из этой же таблицы видно, что фумарат и сукцинат сильно подавляют образование свободного аммиака в пробах с АК+Д-НАД+НА. Количество его не только не возрастает, но даже спускается ниже контрольных величин.

Весьма вероятно, что фумарат блокирует образование аммиака из АК при участии Д-НАД путем усиленного образования НАД-сукцината, и подавления его распада на НАД и фумарат.

Таблица 2

Образование свободного аммиака из добавленного аспартата и его утилизация в митохондриальной фракции печеночной ткани в присутствии Д-НАД

Условия опыта	Прирост аммиака по сравнению с инкубированным контролем в $\mu\text{кг}/\text{мг}$ белка	Утилизация аспартата в $\mu\text{кг}/\text{мг}$ белка
Аспартат	$1,43 \pm 0,57$ (16)	$36,2 \pm 7,8$ (6)
Д-НАД+НА	$2,88 \pm 0,9$ (16)	—
АК+Д-НАД+НА	$8,77 \pm 0,63$ (16)	$209,7 \pm 10,0$ (6)
АК+Д-НАД+НА+сукцинат	$-1,1 \pm 0,28$ (6)	
АК+Д-НАД+НА+фумарат	$-0,8 \pm 0,2$ (6)	

В опытах без добавлений (инкубированная проба) образуется $2,62 \pm 0,6 \mu\text{кг}$ аммиака на 1 мг белка.

Таблица 3

Образование НАД-сукцината и АМФ-сукцината из добавленных НАД+фумарат и АМФ+фумарат в митохондриальной фракции печени (о синтезе вышеупомянутых соединений судили по приросту АК в гидролизатах безбелковых экстрактов митохондрий)

Условия опыта	Количество аспартата в $\mu\text{кг}$ на 1 мг белка
Фиксированный контроль	$2,65 \pm 0,28$ (4)
Инкубированный контроль	$3,4 \pm 0,08$ (4)
Фумарат	$5,1 \pm 0,3$ (6)
АМФ	$3,4 \pm 0,36$ (6)
НАД	$1,0 \pm 0,13$ (6)
АМФ+фумарат	$9,2 \pm 0,5$ (6)
НАД+фумарат	$11,0 \pm 0,4$ (6)

Действительно, последующие исследования показали (табл. 3), что в присутствии добавленных НАД+фумарат и АМФ+фумарат к митохондриальной фракции печеночной ткани синтезируются соединения, гидролиз которых приводит к образованию АК. Количество образовавшейся АК в пробах НАД+фумарат и АМФ+фумарат составляет $11,0 \pm 0,4$ и $9,2 \pm 0,5$ мкг на 1 мг белка — соответственно. В контрольных опытах обнаруживается $3,4 \pm 0,08$ мкг АК.

Из приведенных результатов становится очевидным, что в пробах НАД+фумарат, АМФ+фумарат образуются НАД-сукцинат и АМФ-сукцинат.

Полученные результаты показывают также, что в опытах с одним фумаратом отмечается некоторый прирост АК (обнаруживается $5,1 \pm 0,3$ мкг АК на 1 мг белка), что, по всей вероятности, обусловлено его переходом в щавелево-уксусную кислоту и образованием из последней АК. Понижение уровня аммиака при наличии одного фумарата следует объяснить связыванием аминокруппы аденин-нуклеотидов. Полученные результаты подтверждают наше предположение в отношении механизма действия фумарата на эндогенное аммиакообразование (табл. 1).

В пробах с НАД уровень АК значительно понижен ($1,0 \pm 0,13$). Это можно объяснить тем, что НАД, отщепляя аммиак, переходит в Д-НАД, а последний усиливает утилизацию АК. Аналогичные результаты нами были получены в предыдущих исследованиях (¹²) и в отношении нервной ткани.

Образование НАД-сукцината в присутствии НАД и фумарата является веским подтверждением выдвинутого нами механизма (¹³) о том, что продукция аммиака из АК происходит путем конденсации АК с Д-НАД с образованием НАД-сукцината, который далее расщепляется на НАД и фумарат. НАД, отщепляя свободный аммиак переходит в Д-НАД, который вновь включается в цикл.

Ս. Դ. ՄՈՎՍԵՍՅԱՆ, Ռ. Դ. ՔԱՄԱԼՅԱՆ

ՆԱԴ-սադաթթվի համադրումը ՆԱԴ-ից և ֆումարաթթվից ճազարների լյարդի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում

Ճազարների լյարդի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայի վրա կատարած ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ ֆումարաթթուն և սադաթթուն (վերջինս հավանական է ֆումարաթթվի վերափոխման ճանապարհով) խիստ կերպով արգելակում են ամոնիակի արտազատումը ՆԱԴ-ից և ԱՄՖ-ից: Նույն երևույթը նկատվում է ասպարազինաթթվի և դեամինո-ՆԱԴ-ի համատեղ մասնակցության դեպքում: Ստացված փաստերը վկայում են ՆԱԴ-սադաթթվի և ԱՄՖ-սադաթթվի դոյացման մասին: Որպես ապացույց այդ եզրակացության ծառայում է մեր կողմից ստացված հետևյալ փաստը: Երբ ՆԱԴ-ը կամ ԱՄՖ-ը և ֆումարաթթուն ավելացվում են միասին լյարդի միտոքոնդրիաներին, ապա ինկուբացիայից հետո մեկուկուսացրած սպիտակուցազուրկ հեղուկի հիդրոլիզը բերում է ասպարազինաթթվի զգալի առաջացման: Ստացված տվյալները հաստատում են նախորդ աշխատանքներում մեր կողմից առաջ քաշված տեսակետն այն մասին, որ դեամինո-ՆԱԴ-ի վերամինացումը ասպարազինաթթվով ընթանում է ՆԱԴ-սադաթթու միջանկյալ միացության համադրման ճանապարհով:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Դ Ր Ա Շ Ա Ն ՈՒԹՅՈՒՆ

¹ C. E. Carter and L. H. Cohen, *Feder, Proc.*, 14, 189 (1955). ² C. E. Carter and L. H. Cohen, *J. Biol. Chem.*, 222, 17 (1956). ³ W. K. Joklik, *Biochem. J.*, 66, 333 (1957). ⁴ D. R. Wilken and R. G. Hansen, *J. Biol. Chem.*, 236, 1051 (1961). ⁵ C. L. Davey, *Arch. Biochem. Biophys.*, 95, 296 (1961). ⁶ E. Okuhara and R. G. Hansen *J. Biochem.*, 55, 287 (1961). ⁷ J. B. Wyngaarden and R. A. Greenland, *J. Biol. Chem.*, 238, 1054 (1963). ⁸ C. E. Carter, *J. Biol. Chem.*, 223, 139 (1956). ⁹ С. Г. Мовсесян и Г. Х. Бунятян, *Вопр. биохимии мозга*, Изд. АН АрмССР, 4, 1968. ¹⁰ O. H. Lowry, N. T. Rosebrough, A. L. Farr and R. T. Randal, *J. Biol. Chem.*, 193, 265, (1951). ¹¹ А. Н. Сулакова, Г. П. Труш и А. Явилякова, *Вопр. мед. химии*, 8, 538, 1962. ¹² Р. Г. Камалян, Г. Х. Бунятян и С. Г. Мовсесян, „Биологический журнал Армении“, 1968. ¹³ Г. Х. Бунятян и С. Г. Мовсесян, *Вопросы биохимии мозга*, Изд. АН АрмССР, 2, 5, 1966.